



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE HIDALGO**

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

***“ESTUDIO DE CITOTÓXICIDAD DE METALES PESADOS (Pb,
Cd, Co y As) EN CÉLULAS EPITELIALES DE INTESTINO
DELGADO DE RATA MACHO-Wistar”***

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

REYES TORAL NAYELLI

ASESORA DE TESIS:

DRA. MARÍA DEL CARMEN VALADEZ VEGA

QA

Pachuca de Soto, 2009

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



Dedicatoria

Especialmente dedicado a mis Padres que siempre estuvieron conmigo apoyándome con esas palabras de aliento en las que encontraba tranquilidad, confianza y que siempre creyeron en mi.

A mis hermanos con quienes he pasado momentos muy divertidos y que además siempre me prestaron atención y me motivaban para seguir adelante.

A Miguel con quien siempre he contado incondicionalmente, que ha sido mi inspiración en todo momento.

A todos ustedes los quiero con todo mi corazón!!!

Agradecimientos

*A **mis padres y hermanos** por apoyarme en todas mis decisiones y por brindarme siempre su apoyo para seguir adelante.*

*A **Miguel** que estuvo presente en todo momento para ayudarme y darme todo su cariño.*

*A mi gran amiga **Gaby**, con quien no solo fue una compañera de estudio, sino también mi cómplice y un gran apoyo para mí.*

*A mi asesora de tesis, la **Dra. María del Carmen Valadez** quién siempre me dedico tiempo y paciencia para realizar este trabajo.*

*A mi amigo **Victorio**, quien me enseñó a trabajar con las ratas que sacrifique, y que además me hacía reír contándome su vida.*

*A los **Doctores; Marco Becerril y Manuel Sánchez**, quienes me sacaban de apuros en el laboratorio y mostraron apoyo en la realización de este trabajo.*

*A los doctores; **Clara Zúñiga, Dr. Roberto Villagómez y al Ingeniero Ernesto Alonso Cruz**, quienes invirtieron tiempo para la revisión de este trabajo.*

*A **Leslie e Ibeth**, grandes compañeras de laboratorio que me sacaban de apuros en algunas ocasiones y con quienes compartí momentos muy divertidos.*

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
I. RESUMEN	10
II. INTRODUCCIÓN	11
III. ANTECEDENTES	13
A. IMPORTANCIA DE LA ALIMENTACIÓN	13
B. CONDICIONES DE CONTAMINACIÓN DE LOS ALIMENTOS	13
B.1. Contaminación biológica alimentaria	14
B.2. Contaminación química alimentaria	14
C. FUENTES DE CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS	15
C.1. Suelo	15
C.2. Agua	16
C.3. Aire	16
C.4. Alimentos	16
D. METALES PESADOS	17
D.1. Toxicidad del plomo (Pb)	20
D.1.1. Exposición	20
D.1.2. Metabolismo	21
D.1.3. Mecanismo de toxicidad	22
D.1.4. Efectos sobre la salud	22
D.2. Toxicidad del cadmio (Cd)	24
D.2.1. Exposición	24
D.2.2. Metabolismo	25
D.2.3. Mecanismo de toxicidad	26
D.2.4. Efectos sobre la salud	26
D.3. Toxicidad del arsénico (As)	27

D.3.1. Exposición	28
D.3.2. Metabolismo	29
D.3.3. Mecanismo de toxicidad	31
D.3.4. Efectos sobre la salud	32
D.4. Toxicidad del cobalto (Co)	33
D.4.1. Exposición	34
D.4.2. Metabolismo	34
D.4.3. Mecanismo de toxicidad	35
D.4.4. Efectos sobre la salud	36
IV. JUSTIFICACIÓN	37
V. OBJETIVOS	38
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	39
A. MATERIALES	39
A.1. Reactivos	39
A.2. Material biológico	39
B. MÉTODOS	40
B.1. Preparación de las soluciones de metales	40
B.2. Estudio de citotoxicidad de Pb, Co, Cd y As en las células de intestino delgado mediante la técnica de Frotis.	41
B.2.1. Obtención del intestino	41
B.2.2. Estudio de Viabilidad celular mediante la técnica de Frotis	41
B.3. Estudio de citotoxicidad de Pb, Co, Cd y As mediante cultivo primario de células epiteliales de intestino delgado de rata-Wistar.	42
B.3.1. Liberación de las células	42
B.3.2. Estudio de viabilidad celular mediante células libres	42
B.4. Análisis estadístico	43
A.1. Arsénico	44
A.2. Cadmio	44
A.3. Cobalto	45
A.4. Plomo	45
VIII. DISCUSIONES	54
IX. CONCLUSIONES	70

X. PERSPECTIVAS	71
XI. REFERENCIAS	72
XII. ANEXOS	92
XIII. GLOSARIO	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.- Concentraciones utilizadas de cada metal para medir la viabilidad celular mediante la técnica de Frotis.	40
Tabla 3.- Concentraciones utilizadas de cada metal para medir la viabilidad celular mediante el estudio de células libres.	40
Tabla 4. Dosis inhibitoria media para el estudio de frotis y células libres en arsénico y cadmio.	48
Tabla 5. Dosis inhibitoria media para el estudio de frotis y células libres en cobalto y plomo	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto citotóxico del arsénico en frotis y células libres	47
Figura 2. Efecto citotóxico del cadmio en frotis y células libres	49
Figura 3. Efecto citotóxico del cobalto en frotis y células libres	50
Figura 4. Efecto citotóxico del plomo en frotis y células libres	52
Figura 5. Comparación de muestras por concentración de arsénico, cadmio y plomo.	53

I. RESUMEN

Los metales pesados a menudo son contaminantes presentes en el medio ambiente siendo los alimentos una fuente importante de contaminación ya que sirven como vehículos de los metales y deben su presencia a diferentes causas, que van desde su obtención o cultivo hasta su industrialización y distribución. Algunos metales pueden ser esenciales para los seres vivos, mientras que otros pueden llegar a ser tóxicos ya que muchos de ellos no pueden ser metabolizados o eliminados por el organismo ocasionando su acumulación en órganos y tejidos, lo cual depende del metal y su concentración.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto citotóxico del plomo, cadmio, cobalto y arsénico en células epiteliales de intestino delgado de ratas Wistar así como la determinación de la dosis inhibitoria media (DI50) para cada metal. Trozos de intestino y células liberadas del intestino, fueron incubados con diferentes concentraciones de metales y se midió el daño celular mediante la técnica de exclusión con azul tripán reportándose los resultados como viabilidad celular y número de células que no sufrieron daño. Los resultados mostraron que los metales que causaron mayor efecto citotóxico sobre las células epiteliales fueron plomo y arsénico seguidos de cobalto y cadmio; siendo mayor el daño cuando las células son liberadas del intestino, ya que se encuentran fuera de su entorno natural mostrándose desprotegidas y expuestas a los metales, por consiguiente, la ingesta constante de alimentos con elevados contenidos de plomo, cobalto, cadmio y arsénico puede ser perjudicial para la salud ya que se ha demostrado que causan daño en las células del intestino delgado en donde se lleva a cabo la absorción de nutrientes y otras sustancias, pudiéndose ver afectados órganos y tejidos.

II. INTRODUCCIÓN

Existen diversos productos esenciales para sostener la vida humana que provienen directa o indirectamente de plantas y animales, obteniéndose a través de ellos energía y elementos esenciales que permiten mantener en funcionamiento los procesos biológicos, conservar la masa corporal y sostener la vitalidad (Mataix, 2002; Schinitman, 2005).

La moderna explotación agrícola se auxilia de una enorme cantidad de productos químicos, que dejan huella en los alimentos; a ello se suman los residuos que las actividades mineras, industriales y urbanas que se esparcen por tierra, aire y agua (Wienk ,1999) y que llegan a los cultivos, la pesca y los forrajes (Valle y Lucas, 2000), ocasionando que diversas sustancias pasen a formar parte de tejidos animales y vegetales que pueden entrar al cuerpo humano cuando se consumen como alimentos en forma de carne, productos lácteos, pescado, verduras y fruta (Wienk ,1999); así mismo dichos compuestos pueden entrar al alimento como sustancias no añadidas de manera intencional, pudiendo ser incorporadas en cualquier etapa de su procesado, transporte o almacenaje (Mariné y Vidal, 2000). Actualmente el ser humano se encuentra expuesto a diversas sustancias químicas, algunas de ellas son benéficas para la salud como los principales componentes de los alimentos, pero otras presentes en los mismos o en el medio ambiente pueden ser perjudiciales para la salud y la probabilidad de que dichas sustancias produzcan efectos perjudiciales depende de la magnitud, frecuencia y duración de la exposición a ellas (García, 2000).

Los metales constituyen una importante clase de agentes tóxicos que suponen un riesgo significativo para la salud por exposición ocupacional así como

ambiental y su acumulación en tejidos vegetales puede llegar a producir daños genotóxicos en sus células (García, 1992); algunos metales como son el cobre y el selenio, son esenciales para el funcionamiento metabólico normal en forma de oligoelementos (Maizlish, 1995) pero a niveles altos resultan tóxicos; una vez absorbido un metal, el principal medio de transporte es la sangre y su cinética precisa depende de la capacidad de difusión, las formas en que se liga, las tasas de biotransformación, la disponibilidad de ligandos intracelulares y otros factores que llegan a afectar a órganos como por ejemplo el hígado, los riñones y los huesos, los cuales pueden almacenar metales a concentraciones relativamente elevadas durante años (Claudio, 2003), sin embargo metales como el plomo, arsénico y el mercurio, son considerados como xenobióticos capaces de ejercer efectos tóxicos como mutaciones y daños genéticos a cualquier nivel de exposición (Reilly, 1980).

La estabilidad atómica intrínseca de los metales permite que sean relativamente fáciles de rastrear y medir en las muestras biológicas y en la actualidad se investiga intensamente sobre la contribución de la exposición de bajo nivel a los metales xenobióticos en las enfermedades crónicas y en las variaciones sutiles que puedan tener consecuencias sobre la salud (Dupin, 1997).

III. ANTECEDENTES

A. IMPORTANCIA DE LA ALIMENTACIÓN

Los alimentos son principalmente productos orgánicos de origen agrícola, ganadero o industrial (producidos, en este último caso, a partir de sustancias naturales o sus derivados) que normalmente se ingieren por vía oral (Wildman R., 2000) y aportan individualmente ciertas sustancias químicas a partir de las cuales el organismo puede realizar dos importantes procesos; a) producción de energía para el funcionamiento orgánico, calor corporal, esfuerzos musculares, movimientos entre otras funciones y b) crecer y reponer la propia masa corporal. Así mismo, los alimentos aportan otras importantes sustancias químicas que regulan los dos procesos anteriores (Mataix, 2002); esta energía es obtenida de los nutrientes o combustibles del cuerpo, tales como: hidratos de carbono, lípidos, proteínas, vitaminas y micronutrientes (Baker, 2003; Caussy, 2003), pero también existen aquellas sustancias consideradas como no nutrientes que no desempeñan ninguna función en nuestro organismo y que casualmente se encuentran en forma natural en el alimento o bien a causa de la manipulación de los mismos a las que podemos estar expuestos como lo son; la utilización de aditivos, productos plaguicidas y antibióticos con que tratan algunos vegetales y animales, nuevas técnicas de conservación de alimentos como envasado al vacío, atmósfera modificada, esterilización por radiación, entre otros que pueden alterar las funciones de nuestro organismo (García Sánchez, 1992; Dupin, 1997).

B. CONDICIONES DE CONTAMINACIÓN DE LOS ALIMENTOS

Las relaciones entre el ambiente y la alimentación pueden abordarse desde distintos puntos de vista como lo son: Influencia en la selección de alimentos,

determinación del tipo de alimentos disponibles en una determinada área geográfica por lo que se condiciona notablemente los hábitos alimentarios, composición nutritiva de los alimentos (en especial a los micronutrientes), lo que se puede constituir como una fuente de contaminación directa o indirecta de los alimentos (Mariné y Vidal, 2000). Los alimentos pueden ser fuente de tóxicos, intrínsecos o contaminantes, por lo que en la mayoría de los casos actúan como vehículos para los compuestos tóxicos, que a menudo se encuentran presentes en el medio ambiente o resultado de los procesos de elaboración de los mismos (Wienk ,1999); la contaminación de los alimentos consiste en la presencia en éstos y otros productos relacionados, de sustancias de origen biológico o químico y son consideradas como riesgosas o tóxicas para la salud del consumidor.

B.1. Contaminación biológica alimentaria. Es un fenómeno que se presenta por la invasión de microbios durante la elaboración, la manipulación, el transporte y la distribución al público de los alimentos u originada por el mismo consumidor, siendo las principales causas:

- Animales enfermos que dan origen a productos contaminados; tal es el caso de vacas lecheras con tuberculosis, que producen leche con ese bacilo o la carne de cerdo infectada con triquina.
- Personas portadoras de enfermedades que manipulan alimentos y los contaminan, tal son los casos de enfermos con cólera, tifoidea, y enfermedades gastrointestinales, entre otras.
- La contaminación de alimentos durante la elaboración, manipulación, transporte y distribución al público por falta de las previsiones sanitarias requeridas (García, 2000).

B.2. Contaminación química alimentaria. Se debe a la presencia de elementos o sustancias químicas provenientes de desechos de actividades humanas, adición

deliberada de sustancias a los alimentos o sustancias tóxicas de origen natural que los convierten en un peligro para la salud, este tipo de contaminación puede ser causada por:

- ✚ La presencia de metales pesados, por lo general tóxicos en bajas concentraciones, siendo los principales mercurio, plomo, arsénico, cadmio, cobalto, estaño y manganeso.
- ✚ Pesticidas, plaguicidas, insecticidas, fungicidas, herbicidas o restos de medicamentos y sustancias de crecimiento aplicados a los animales, como antibióticos y hormonas.
- ✚ Aditivos para preservar y colorear los alimentos.

C. FUENTES DE CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS

El desarrollo tecnológico, el consumo masivo e indiscriminado de combustibles, la producción de desechos principalmente urbanos y la utilización de diversos productos químicos ha provocado la presencia de muchos metales en cantidades importantes en el ambiente, provocando numerosos efectos sobre la salud y el equilibrio de los ecosistemas los cuales se incorporan con los alimentos o como partículas que se respiran y se van acumulando en el organismo hasta llegar a límites de toxicidad, si la incorporación es lenta se producen intoxicaciones crónicas que dañan a tejidos y órganos en los que se acumulan (García, 2000), siendo las fuentes de contaminación por metales pesados las que a continuación se mencionan.

C.1. Suelo: Es alterado como resultado de las actividades mineras, la utilización de sustancias químicas para los campos de cultivo y la industria; por lo que los metales tienden a acumularse en la superficie (Baird, 1999) quedando accesibles al consumo de las raíces de las plantas cultivadas en terrenos contaminados, absorbiendo más oligoelementos y aumentando la concentración

en los tejidos vegetales (Kabata y Pendias, 2001). Excesivas concentraciones de metales en los suelos podrían impactar la calidad de los alimentos y el agua debido a la filtración afectando la seguridad de la producción de cultivos y la salud del medio ambiente ya que estos se mueven a través de la cadena alimenticia vía consumo de plantas por animales y estos a su vez por humanos (Gulson y col., 1996).

C.2. Agua: El agua puede llegar a ser fuente de contaminación cuando aguas residuales no tratadas provenientes de minas y fábricas llegan a los ríos provocando su profanación; del mismo modo, el uso repetido de fertilizantes químicos conducen a su contaminación (Martínez y Beltrán, 1999), ya que los metales pesados son arrastrados por las aguas superficiales a los lagos y ríos donde también contaminan los mantos freáticos que también están expuestos a ser contaminados a través de las lluvias que arrastran metales como el plomo, cadmio, mercurio y molibdeno, así también sulfatos y nitratos producidos por la lluvia ácida (Gideon y col., 1999).

C.3. Aire: La actividad industrial y minera arroja al ambiente diversos metales tóxicos y dañinos para la salud (Dugast, 1978); los metales originados en las fuentes de emisión generadas por el hombre (antropogénicas) incluyendo la combustión se encuentran en la atmósfera como material suspendido que respiramos y que además pueden llegar a sedimentar en plantas, suelo y agua acarreados por el aire.

C.4. Alimentos: Los alimentos pueden llegar a contaminarse desde su cosecha y obtención en el campo hasta su industrialización (Mariné y Vidal, 2000), el embalaje y la elaboración; también pueden introducir sustancias químicas como metales pesados en los alimentos industrializados ya sea por los diversos instrumentos con los que tienen contacto, la adición de sustancias químicas y su envasado. Recurrir a la agricultura ecológica es una forma sencilla de evitar

la utilización de pesticidas y por tanto la entrada de metales pesados a nuestro organismo (Boudene, 1981).

D. METALES PESADOS

De los 106 elementos conocidos por el hombre, 84 son metales y se denomina metales pesados a aquellos elementos químicos cuya densidad es por lo menos cinco veces mayor que la del agua y además pueden jugar un papel importante en el metabolismo normal, por ejemplo: calcio, potasio, sodio, magnesio, hierro, zinc, selenio, manganeso, cobre, molibdeno, cobalto, cromo, sílice, níquel y estaño o bien tóxicos como el cadmio, plomo, mercurio, cromo, berilio, arsénico y bario (Reilly, 1980) por lo que no es de extrañar que las posibilidades de contaminación metálica en el ambiente sean numerosas. Hay que tener presente que los metales son materias naturales que (desde la edad de hierro) han desempeñado un papel fundamental en el desarrollo de las civilizaciones; el problema surge cuando prolifera su uso industrial y su empleo creciente en la vida cotidiana termina por afectar a la salud. En la Tabla 1 se pueden apreciar las propiedades de algunos metales pesados y sus características toxicológicas, puesto que algunos de ellos presentan problemas a ciertas concentraciones lo que constituye un serio peligro para la salud (Claudio, 2003) ya que pueden afectar a más de un órgano al ser ingeridos y distribuidos a diferentes partes a través de la sangre (Gennart, 1992).

La toxicidad de un metal depende de la dosis en que se ingiera, así como de la cantidad excretada siendo algunas veces la diferencia entre la concentración tóxica y la concentración requerida es mínima (Claudio, 2003); la interacción de los metales con las células vivas es que estos pueden desplazar a metales esenciales o actuar como mutágenos y cancerígenos (Lloyd y col., 2005).

Tabla 1. Propiedades de algunos elementos considerados como metales pesados

Metales Pesados	
<p>Cadmio</p> <p>Ca</p>	<p>Es un micronutriente esencial para los humanos, animales y plantas; es persistente en el ambiente y si es absorbido por el organismo humano puede persistir por décadas antes de ser excretado. En humanos, la exposición prolongada se relaciona con la disfunción renal, también puede llevar a enfermedades pulmonares, se la ha relacionado con el cáncer de pulmón y puede provocar osteoporosis en humanos y animales. El ingreso medio diario, para humanos se estima en 0,15 µg procedente del aire y 1 µg del agua.</p>
<p>Cobre</p> <p>Cu</p>	<p>Es un elemento esencial para la vida humana, pero en dosis elevadas puede provocar anemia, irritación del estómago e intestino y daño renal y hepático. Los pacientes con la enfermedad de Wilson, pueden tener mayores riesgos en caso de sobreexposición al cobre; el cobre puede encontrarse en el agua potable, procedente de las cañerías de ese metal o de aditivos empleados para evitar la proliferación de algas.</p>
<p>Cromo</p> <p>Cr</p>	<p>Se usa en aleaciones y pigmentos para cemento, papel, pinturas, caucho y otras aplicaciones; frecuentemente se acumula en ambientes acuáticos, por lo que existe cierto riesgo de ingerir pescado contaminado. Los bajos niveles de exposición pueden provocar irritación de la piel y úlceras, mientras que la exposición prolongada puede causar daños hepáticos y renales, al tejido nervioso y al sistema circulatorio.</p>
<p>Mercurio</p> <p>Hg</p>	<p>Es un contaminante global proviene principalmente de la de gasificación de la corteza terrestre, las emisiones volcánicas y la evaporación de las masas de agua; es utilizado en pilas, lámparas y termómetros. Las principales fuentes de emisión son la fabricación de cloro en celdas de mercurio,</p>

	<p>producción de metales no ferrosos y la combustión del carbón mineral; es tóxico y no se lo encuentra naturalmente en organismos vivos. Las intoxicaciones con mercurio pueden provocar temblores, gingivitis, alteraciones psicológicas y aborto espontáneo, algunos procesos biológicos naturales pueden generar compuestos metilados de mercurio que se bioacumulan en los organismos vivos, especialmente en peces; la principal ruta de ingreso a los seres humanos es por la cadena alimentaria y no por inhalación.</p>
<p>Níquel Ni</p>	<p>El níquel es necesario para la formación de glóbulos rojos, pero en exceso es medianamente tóxico. No se conocen efectos de la sobreexposición de corto plazo, pero en el largo plazo puede provocar disminución del peso corporal, irritación de la piel y problemas cardíacos y hepáticos, puede acumularse en ambientes acuáticos, pero no experimenta biomagnificación en la cadena alimentaria.</p>
<p>Plomo Pb</p>	<p>Proviene de fuentes naturales y antropogénicas, puede ingresar al organismo por el agua, alimentos, tierra y polvo desprendido de viejas pinturas conteniendo plomo; asimismo, se le emplea en aleaciones, baterías, compuestos y pigmentos, revestimientos para cables, proyectiles y municiones. La exposición puede tener diversos efectos en humanos, pudiendo afectar la síntesis de hemoglobina, la función renal, el tracto gastrointestinal, las articulaciones y el sistema nervioso.</p>
<p>Selenio Se</p>	<p>Es un no metal necesario en pequeñas cantidades para los seres humanos y ciertos animales, pero en exceso puede provocar fatiga, irritabilidad, caída del cabello y las uñas y daño hepático, renal y daño severo del sistema nervioso; se acumula en los tejidos vivos, especialmente en los peces.</p>

Fuente: FAO (2004), Soil heavy metals.

D.1. Toxicidad del plomo (Pb)

El plomo es un metal pesado, azuloso, suave y maleable, usado en varios procesos industriales, es considerado desde la antigüedad como "nocivo y pestilente" incluso se piensa que fue una de las causas de la caída del Imperio Romano por haber sido ampliamente empleado para elaborar utensilios domésticos como ollas, copas, jarras, tuberías y otros (Valle y Lucas, 2000); los romanos usaban incluso el acetato de plomo como edulcorante para el vino, agudizando la intoxicación de quien lo bebía (Nriagu, 1998; Claudio 2003).

D.1.1. Exposición

En la actualidad la carga corporal de plomo en la población en general se ha calculado que es alrededor de 1000 veces mayor que la del hombre prehistórico (Patterson, 1991), siendo las principales fuentes de contaminación por este metal las fundidoras, fábricas de baterías, algunas pinturas, loza de barro vidriado e incluso el cristal que se utiliza para almacenar o cocinar alimentos y las gasolinas con tetraetilo de plomo (Elinder, 1988; Gerhardsson, 2002); la exposición puede ocurrir a través de la ingesta de los alimentos ya que se puede encontrar presente en el aire, agua y suelo y depositarse en los vegetales que al ser consumidos por los animales pasa a formar parte de su organismo (De Temmerman y Hoenig, 2004) llegando a ser considerado como un material peligroso en la mayoría de los productos químicos, considerándose dentro del 10% de los metales más peligrosos para la salud humana (Mushak, 1989).

D.1.2. Metabolismo

El plomo puede ser inhalado como diminutas partículas en un rango de 0.01 a 5 μm , depositándose en la región alveolar de las vías respiratorias y posteriormente siendo absorbidas por el pulmón; estudios realizados con humanos han demostrado que la absorción toma un tiempo de 24 h (Hursh y Suomela, 1968; Chamberlain, 1985) y depositándose en el tejido pulmonar (Barry, 1975) mientras que partículas más grandes se depositan en la nariz y boca siendo absorbido por el tracto gastrointestinal, la absorción a través de la piel es muy baja pues un estudio mostró que la absorción fue solo de un 0.06 % durante un mes (Moore, 1980).

Una vez ingerido puede formar sales inorgánicas y orgánicas, las sales inorgánicas se forman cuando el plomo tiene una valencia de +2, mientras que en las sales orgánicas su valencia puede ser de +4 (Templeton, 2000); posee una elevada afinidad por las proteínas (metaloproteínas) y a algunas enzimas (metaloenzimas), a las cuales se puede unir por tres mecanismos: (1) la interacción con sitios estereoespecíficos que constituyen los sitios de unión natural de los metales divalentes de importancia biológica; (2) la interacción electrostática, en dominios con alta densidad de carga negativa; (3) la interacción covalente con grupos sulfhidril con los cuales forma mercáptidos como resultado de la unión del metal con las proteínas se presentan alteraciones estructurales y funcionales de esas macromoléculas (Lloyd, 2005; Pallares, 2005). El plomo unido o no a proteínas o enzimas se absorbe a través de las vellosidades del intestino delgado, los cuales contienen a células especializadas llamadas enterocitos para llevar a cabo la absorción y en cuestión de minutos pasa del plasma a las células sanguíneas (Campbell, 1984) posteriormente pasa a los huesos en donde tiende a reemplazar al calcio (Barry, 1975), el resto se distribuye a otros órganos tales como cerebro, riñón,

médula ósea e hígado, algunos de los cuales se dañan aun con bajos niveles de plomo convirtiéndose en órganos blanco.

Solamente una proporción circulante puede ser excretado siendo la vía urinaria la más favorecida (Yokoyama, 2000), mientras que una proporción más pequeña puede desecharse por los fluidos de secreción gastrointestinal o bilis (Ishihara y Matsushiro, 1986) de manera que la mayor parte del plomo que se encuentra en las heces es aquel que no fue absorbido por vía digestiva (Rabinowitz, 1980); también es posible eliminar una pequeña cantidad de plomo por las células que se descaman en piel, pelo y uñas (Rabinowitz, 1977; Foo, 1993) y algunas condiciones fisiológicas que permiten que pueda ser excretado por otros fluidos como la leche materna, semen, saliva (Koh, 2003), sudor, entre otros (Rabinowitz, 1977; Kehoe, 1987; Omokhodion y Cockford, 1991).

D.1.3. Mecanismo de toxicidad

Los mecanismos de acción del plomo a nivel molecular no están bien establecidos, aunque se ha observado que actúa sobre una gran variedad de actividades biológicas en células y tejidos (Gerhardsson, 2002) llegando a causar efectos tóxicos en una larga serie de órganos y tejidos; sin embargo está establecido que se une a los grupos sulfhidril de las proteínas, si esto se produce en una enzima su función puede ser inhibido lo que puede dar lugar a efectos tóxicos.

D.1.4. Efectos sobre la salud

La exposición al plomo inorgánico puede causar daños en el sistema nervioso ya que puede provocar encefalopatía especialmente en los niños y en adultos;

los signos de toxicidad grave son la ataxia, coma y convulsiones (Ehle y McKee, 1990; Maizlish, 1995). El mecanismo de la neurotoxicidad no es claro, sin embargo ha sido propuesta la posibilidad de que puede afectar el metabolismo del sistema nervioso a través de la unión a proteínas en el tejido cerebral (Quintanilla-Vega, 1995) además interfiere con el desarrollo del sistema neurológico, causa crecimiento retardado, déficit de atención, deficiencias visuales, disminución en la capacidad de aprendizaje y resolución de problemas sobre todo en niños (Lindgren, 1996); en exposiciones bajas hay efectos en términos de hormigueo o adormecimiento de brazos y piernas, dolor muscular y umbrales de dolor en los dedos y la disminución de los umbrales de vibración en las manos y los dedos de los pies (Bleecker, 1997; Kovala, 1997; Chuang, 2000).

En la sangre, el plomo puede causar anemia al impedir la formación de moléculas que transportan el oxígeno y la inhibición de la enzima pirimidina-5-nucleotidasa (P5N), también se reduce el tiempo de vida de los eritrocitos probablemente debido a la inhibición de la membrana de células rojas de Na^+ , K^+ -ATPasa de membrana y los cambios estructurales de las proteínas lo que puede causar hemólisis (Gennart, 1992; Solliway, 1996).

Los síntomas de daño en el tracto gastrointestinal después de la exposición suelen aparecer al comienzo y a menudo permanecen durante todo el curso de la enfermedad y son la razón por la cual se diagnostica el envenenamiento por este metal, la mayoría de los casos comienzan con prolongado estreñimiento, indigestión, pérdida de apetito y ocasionalmente diarrea, calambres abdominales intermitentes los cuales a menudo se presentan en intervalos libres de dolor que a veces irradian a la vejiga, el escroto y el riñón siendo frecuente el vomito (Skerfving, 2005).

En cuanto al mecanismo de los efectos mutagénicos, las pruebas demuestran que el plomo se acumula en el núcleo de la célula, sin embargo sólo hay pruebas limitadas de genotoxicidad directa o efectos nocivos al ADN excepto el cromato de plomo que ha sido negativo en la mayoría de los ensayos *in vitro* de genotoxicidad (Silbergeld y col., 2000).

La evidencia experimental indica que puede sustituir al zinc en las proteínas que funcionan como reguladores transcripcionales incluyendo protaminas, también reduce la unión de estas proteínas al reconocimiento de elementos de ADN genómico lo que sugiere una alteración en la expresión genética (Hengstler, 2003); se estima que el tiempo necesario para que una persona expuesta a bajas dosis elimine completamente al metal de sus tejidos, es de 20 años a partir de que cesa la exposición (Schwartz y Stewart, 2001; Tassler, 2001).

D.2. Toxicidad del cadmio (Cd)

El cadmio es un metal blanco azulado, dúctil y maleable, en algunos aspectos es similar al zinc ya que no se degrada en el medio ambiente pero puede cambiar de forma. Las principales utilidades en el medio laboral son las aleaciones con otros metales, fabricación de acumuladores eléctricos, pigmentos y como estabilizante en la industria del plástico (Boudene, 1982).

D.2.1. Exposición

Los seres humanos están expuestos a este metal a través de alimentos contaminados, utensilios de cocina, tabaco y el agua (Dugast, 1978); otra fuente importante de emisión de cadmio es la producción de fertilizantes fosfatados y fungicidas artificiales y cuando está presente en el suelo llega a

ser extremadamente peligroso ya que es absorbido por las plantas y estas a su vez por los animales que dependen de ellas para sobrevivir.

Se ha detectado que puede bioacumularse en alimentos, tales como vísceras (riñón, hígado), moluscos, crustáceos, mejillones, ostras, langostas, peces, granos (especialmente arroz y el germen de trigo) y algunas especies de setas con contenido del orden de mg/kg; a pesar de su bajo contenido los alimentos de origen vegetal constituyen por su elevado consumo una de las principales fuentes dietéticas del metal, siendo tóxico para todos los sistemas y funciones humanas o animales (Spivey Fox, 1988; Groten y col., 1994; McLaughlin y col., 1999).

D.2.2. Metabolismo

La absorción de cadmio en el tracto gastrointestinal es alrededor del 5-8%, por vía respiratoria 15-40%, excepto en niños 37% (Groten y col., 1994) y su absorción a través de la piel es extremadamente baja (Eklund y col., 2003). Durante la inhalación pasa a los pulmones en donde se acumula y es absorbido en la medida del 40%, pasando a las proteínas plasmáticas de la sangre y siguiendo su acumulación en el hígado, riñón y bazo; su penetración intestinal es considerada débil aunque se absorbe bastante mal en los intestinos (sólo en el rango de 5-8%), siendo mayor la absorción en el estomago debido a la unión entre las enzimas presentes en esa zona (Eklund, 2003) posteriormente, pasa al plasma sanguíneo en donde se une de forma selectiva a proteínas de alto peso molecular como la albúmina (Nordberg y Nordberg, 1998), aunque el nivel presente en el plasma es extremadamente bajo puede penetrar en las células sanguíneas en donde la concentración de eritrocitos es mucho mayor que en el plasma y después pasa al hígado en donde se induce a la síntesis de metalotioneína (Lauwerys, 1982) la cual debido a su bajo peso molecular se filtra eficazmente a través de los glomérulos renales y es reabsorbido en el

túbulo proximal donde se acumula gradualmente, así en la exposición crónica el riñón contiene la mayor parte de la carga corporal de cadmio es de 50 al 65% causando daño en el mecanismo de filtración que trae como consecuencia la excreción de proteínas esenciales y azúcares del cuerpo (Groten y col., 1994); cierta cantidad se acumula en los riñones, mientras que una menor proporción se distribuye a otros órganos (McLaughlin y col., 1994). Se excreta principalmente por la orina y a través de la bilis y jugo pancreático por medio de las heces, en el embarazo incluso antes de la formación de la placenta puede llegar al embrión y más tarde se puede excretar en la leche (Harlan, 1985).

D.2.3. Mecanismo de toxicidad

El cuerpo humano no necesita de este metal en ninguna forma por lo que se le considera dañino en dosis pequeñas, ya que inhibe a los grupos SH que intervienen en la mayoría de procesos enzimáticos del organismo lo que puede dar lugar a efectos tóxicos.

D.2.4. Efectos sobre la salud

La inhalación crónica de cadmio daña al sistema respiratorio por lo que se sospecha que es una posible causa de cáncer de pulmón (Sorhan y Esmen 2004; Verougstratete y col., 2003); otros efectos respiratorios crónicos de la exposición son la rinitis crónica, la destrucción del epitelio olfativo, así como el desarrollo de la bronquitis (ATSDR, 1999; Drebler, 2002).

En animales, la ingestión crónica de cadmio provoca el aumento de la presión arterial, tales efectos se han vinculado al aumento de los niveles sanguíneos y la retención de sodio y agua (ATSDR 1999) lo que da lugar a la hipótesis de que la exposición al cadmio en los seres humanos podría estar relacionada con la hipertensión. La ingesta de alimentos o agua que contienen cantidades muy

elevadas (en términos de miligramos) irritan al epitelio gástrico (Lewis, 1997) y pueden causar diarreas, dolor de estomago, vómitos severos y trastorno abdominal agudo (Nordberg, 1993).

Los cálculos renales son más comunes en la población expuesta a este metal pero otros factores pueden incluir al aumento del ácido úrico; los niveles habituales de exposición, el aumento de la excreción de alto peso molecular de proteínas, tales como albúmina y transferrina, son los primeros signos de daño glomerular el cual se cree que es irreversible (Jarup 2002) y pueden aparecer lesiones óseas posterior a la intoxicación crónica grave, lo que ocasionando fracturas espontáneas y la osteoporosis.

Los compuestos de cadmio son débilmente mutagénicos en la mayoría de los sistemas de ensayo (Filipic y Hei, 2004) pero en estudios con animales han demostrado ser genotóxico en algunas células eucariotas incluyendo a las células de los testículos (Yang y col., 2003); el mecanismo por el cual puede ser genotóxico es indirectamente inducir estrés oxidativo en las células como consecuencia de la inhibición de enzimas antioxidantes (Aydin y col., 2003; Bagchi y col., 2000; Jimi y col., 2004) y también ha demostrado inhibir la reparación del ADN (Buchko y col., 2000; Hartwig y col., 2002).

D.3. Toxicidad del arsénico (As)

En el pasado los compuestos inorgánicos de arsénico se usaron predominantemente como plaguicidas, principalmente en cosechas de algodón y huertos frutales. Antes del advenimiento de los antibióticos se le empleaba como medicamento en dosis sumamente pequeñas para tratar padecimientos como la sífilis, leucemia y bronquitis pulmonar (Brooks, 2005). El arsénico es orgánico cuando se halla combinado con carbón ó hidrógeno ó inorgánico

cuando se combina con oxígeno, cloro o sulfuro; siendo el arsénico orgánico el menos tóxico (Budavari y col., 2001), dichos compuestos no tienen olor y la mayoría no tiene ningún sabor especial por esta razón generalmente no se puede saber si están presentes en los alimentos, el agua o el aire, razón por la cual el ser humano puede intoxicarse de manera accidental (Adair, 2006).

El arsénico y sus derivados metilados son conocidos por su carácter carcinogénico aunque son utilizados también en tratamientos de quimioterapia; el arsénico inorgánico es metilado a nivel celular a compuestos orgánicos como el monometil arsénico (MMA), dimetil arsénico (DMA) y trimetil arsénico (TMA) a estos mecanismos celulares de metilación como formas de detoxificación, se ha demostrado que en cualquiera de estas tres formas altera procesos fisiológicos naturales, produce superóxidos (ROS) y altera mecanismos de reparación del ADN (Vasken y Aposhian, 2005).

D.3.1. Exposición

El arsénico es liberado al medio ambiente procedente de fuentes naturales como consecuencia de fenómenos naturales tales como la erosión de depósitos minerales y los volcanes, liberaciones derivadas de actividades humanas como la fundición de metales, combustión de carbón, producción y uso de sustancias químicas y la eliminación inadecuada de residuos puede dar lugar a la contaminación del medio ambiente (Tchounwou y col., 1999). La Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos calcula que unos 75,000 a 100,000 toneladas de arsénico se producen anualmente a escala mundial (NAS, 1977). Más del 80% de los compuestos de arsénico se utilizan para la fabricación de productos con aplicaciones agrícolas, como insecticidas, herbicidas, fungicidas, alguicidas, tratamiento de madera, conservantes, colorantes, medicamentos y para la erradicación de la tenia en el ganado ovino y vacuno; algunos compuestos todavía se utilizan en el tratamiento de ciertas

enfermedades tropicales como la enfermedad africana del sueño, la disentería amébrica y en la medicina veterinaria para el tratamiento de enfermedades parasitarias incluyendo la filariasis en perros y cabeza negra en los pavos y los pollos (Budavari y col., 2001; Carapella, 1992).

En el suelo suele encontrarse como As (III) o As (V), este último tiende a transferirse a la fracción mineral del suelo lo que baja su absorción por parte de las plantas pudiendo dar lugar a la contaminación de acuíferos por lixiviación (Epstein, 2002); en donde el metal puede ser absorbido por peces, mariscos y algas en los que su concentración puede ser alta en donde el metal es transformado en arsenobetaina, arsenofosfolípidos, arsenoazúcares (Cooney y col., 1978; Edmonds y Francesconi, 1981). Otras vías de exposición al arsénico son los alimentos que son expuestos con aguas o plaguicidas que contienen arsénico (Crecelius, 1977).

D.3.2. Metabolismo

Los compuestos arsenicales se absorben a través de las vía digestiva, respiratoria y cutánea siendo esta última de menor exposición; los compuestos orgánicos de arsénico se absorben mejor que los inorgánicos y los pentavalentes más que los trivalentes, sin embargo los compuestos inorgánicos son más tóxicos que los orgánicos y el As (III) es más tóxico que el As (V) (Chalenger, 1951; Braman y Foreback, 1973).

El arsénico suspendido en el aire se encuentra por lo general en forma de As_2O_3 y sus partículas son objeto de una alta deposición en el tracto respiratorio superior, pasando a la región de nasofaríngeo y la zona mucocilar en donde una parte se absorbe al pulmón y pasa a la sangre, mientras que otra fracción es desviada al tracto gastrointestinal (Davison y col., 1974); en el caso del trióxido de arsénico, se absorbe rápidamente mientras que

compuestos como el arseniato de calcio y arseniato de plomo tienen un largo tiempo de retención. La absorción gastrointestinal puede ser mucho menor si la forma química ingerida es insoluble (Charbonneau y col., 1978); cerca de 70-90% de la ingestión de arsénico inorgánico es fácilmente absorbido por el tracto gastrointestinal y luego distribuido a los diferentes órganos mientras que la forma orgánica transformada como arsenobetaína es absorbida casi por completo; en el caso del trióxido de arsénico que es ligeramente soluble en el agua y la absorción gastrointestinal depende de factores como el pH del jugo gástrico y del tamaño de partícula, después de la absorción por los pulmones o el tracto gastrointestinal, el arsénico es transportado por la sangre a otras partes del cuerpo (Charbonneau y col., 1978) en donde se puede ser metabolizado por 2 tipos de reacción; primero la reducción de As (V) a As (III) interactuando este último con los grupos tioles de las proteínas por ejemplo, todas aquellas proteínas que contengan el aminoácido cisteína, esta interacción produce alteraciones en la estructura molecular de las proteínas interrumpiendo su actividad biológica y segundo las reacciones oxidativas de metilación que transforman al arsénico en especies menos tóxicas y más fáciles de excretar por los organismos (Bencko, 1977; Epstein, 2002), posteriormente se fija preferentemente en el hígado, riñones, tracto digestivo, hueso, piel, uñas y cabello (mediante grupos -SH unidos a queratina).

La mayoría del arsénico inorgánico es metilado en el cuerpo, principalmente en el hígado y pasa al riñón en donde se excreta por la orina, el porcentaje de excreción puede variar dependiendo de la forma química y de las especies expuestas. Alrededor del 10-15% en forma de ácido monometilarsénico (MMA), y 60-80% de ácido dimetilarsénico (DMA); con el aumento de dosis, la fracción metilada disminuye (Calderón y col., 1999) y sólo un bajo porcentaje se excreta en las heces (Apostoli y col., 1999); cerca de 50-60% de una dosis oral

de arsénico inorgánico se excreta en una semana y alrededor del 70-75% de arsenobetaína ingerida se excreta en la orina dentro de una semana sin ser metabolizada. La vida media del metal en el organismo es de unas 10 h, aunque se puede detectar en orina hasta 10 días después de su exposición. Durante la lactancia, un pequeño porcentaje de la ingestión puede ser excretado en la leche materna (Concha y col., 1998); otras vías de eliminación aunque de menor importancia son la piel, el cabello, las uñas y el sudor.

D.3.3. Mecanismo de toxicidad

Recientemente el arsénico ha sido utilizado como un agente contra el cáncer en el tratamiento de la leucemia aguda y su acción terapéutica se ha atribuido a la inducción de muerte celular programada (apoptosis) en células de leucemia (Rousselot y col., 1999).

El arsénico actúa a nivel molecular dejando inactivas las enzimas a través de la formación de nuevos enlaces químicos covalentes llamados puentes disulfuro. Las partículas de arsénico que ingresan al tracto respiratorio son absorbidas por el pulmón, allí, de acuerdo a la especie química se interrumpe la actividad mitocondrial inhibiendo el dihidrolipoato, un cofactor necesario de la piruvato deshidrogenasa, esta inhibición altera el ciclo de Krebs e interrumpe la fosforilación oxidativa ya que se bloquea el transporte de electrones pudiendo también inhibir la transformación de la tiamina a acetil-CoA y succinil-CoA y por consiguiente la producción de ATP (ATSDR, 2005; Conner, 1993; Chen y col., 1997); al mismo tiempo se desencadenan en la célula una cascada de reacciones de activación por fosforilación de caspasas que determina la muerte celular (Chen, 1997) y se altera la estructura y función de proteínas relacionadas con la defensa celular como el glutatión (Chang, 1991; Csanaky y col., 2003, Cui, 2004).

D.3.4. Efectos sobre la salud

Tanto toxicidad aguda y subaguda del arsénico involucran a muchos sistemas y órganos incluyendo aparato gastrointestinal, absorción cutánea, daño hepático, hematológico, oftálmicos y sistemas cardiovascular, respiratorio, nervioso, renal, incluyendo la pérdida de resistencia a infecciones (ATSDR, 2005; Chen y col., 1997).

La intoxicación aguda de la forma inorgánica puede causar el síndrome gastrointestinal que comienza con un sabor metálico y resequedad en la boca, vómitos, diarrea profusas, cólicos intensos, deshidratación, debilidad y depresión, este síndrome es causado por la parálisis de los capilares de control en el tubo digestivo provocando una disminución en el volumen de sangre, presión arterial, desequilibrio electrolítico y shock (ATSDR, 2005; Armstrong, 1984).

Los efectos respiratorios incluyen rinitis, faringitis, laringitis, bronquitis, tos crónica y enfermedades pulmonares obstructivas (Adonis, 2005); exposiciones muy altas pueden causar la perforación del tabique nasal, en estudios más recientes han reportado cáncer de pulmón (Chen y col., 1997). La piel es el órgano crítico a largo plazo después de la exposición oral al arsénico y puede causar lesiones en las mucosas, lo que lleva a melanosis, hiperpigmentación y despigmentación (Ahsan y col., 2006).

La exposición crónica causada por la ingesta de agua potable y medicamentos, puede inducir a la cirrosis hepática e hipertensión (Axelson y col., 1978); la exposición prolongada al arsénico tiene un efecto depresor sobre el sistema hematopoyético, provocando anemia; los efectos en el sistema nervioso se pueden manifestar como daños en glóbulos rojos y en médula ósea, causando

la disminución en la producción de glóbulos rojos y blancos, nervios y el cerebro (Chen y col., 1997). A exposiciones muy altas de arsénico inorgánico puede causar infertilidad y abortos en mujeres, ya que durante el embarazo es capaz de traspasar la placenta (Beckman, 1977); en ensayos de laboratorio los animales (ratones) expuestos a bajas dosis de manera crónica presentaron camadas con pocas crías (Chen, 1997), siendo la especie inorgánica un carcinogénico comprobado (Chiou y col., 1995; 2001) ya que puede indirectamente dañar al DNA y el material genético, mientras que el arsénico orgánico no puede causar cáncer ni daño al ADN.

D.4. Toxicidad del cobalto (Co)

El cobalto es un elemento relativamente raro de la corteza terrestre y es también considerado como un metal esencial para los mamíferos en la forma de cobalamina (vitamina B₁₂), en donde forma complejo con cuatro núcleos de pirrol unidos en un anillo llamado corrin similares a las porfirinas (Keane y col., 2002), el cuerpo humano adulto contiene aproximadamente 1 mg de este metal.

Los compuestos de cobalto tienen estados de oxidación (II) o (III), siendo el primero el más estable; los principales compuestos de interés toxicológico son sus aleaciones y materiales compuestos como óxido de cobalto y tetróxido, las sales tales como cloruro de cobalto (II), sulfato y sulfuro. También se usa en aleaciones, para triturar, cortar y articulaciones artificiales para la rodilla y la cadera. Los compuestos de este metal se usan también para colorear vidrio, cerámicas y pinturas, como secador de esmaltes y pinturas para porcelana (Coles, 1955; Shuttleworth y col., 1961 y Schirmacher, 1967). La especie radioactiva tiene usos comerciales y en medicina el ⁶⁰Co se usa para esterilizar equipo médico y artículos de consumo, en radioterapia para

pacientes con cáncer, para fabricar plásticos e irradiar alimentos, el ^{57}Co es usado en investigación clínica y científica (Coles, 1955).

D.4.1. Exposición

El Cobalto es un elemento que se encuentra de forma natural en el medio ambiente en el aire, agua, suelo y rocas por lo que través del proceso de meteorización, es lixiviado a partir de su matriz material de corteza terrestre y penetra en el suelo de los sistemas de sedimentos (Punsar y col., 1975; Schroeder y col., 1967) que es en parte absorbido por animales y plantas especialmente en frutos, semillas y animales; niveles elevados en el suelo puede ser consecuencia de actividades humanas tales como la aplicación de lodos que contienen cobalto o los fertilizantes fosfatados, la eliminación de los residuos que contienen cobalto y la deposición atmosférica de las actividades como la minería, fundición, refinación o de combustión (Hamilton, 1994). Los isótopos radiactivos del cobalto no están presentes de forma natural en el medio ambiente, pero estos son liberados a través de las operaciones de plantas de energía nuclear y accidentes nucleares (Delpeux y col., 2002). La mayoría del cobalto ingerido por el ser humano es inorgánico, representando la vitamina B_{12} una pequeña fracción, siendo principales fuentes de esta vitamina los alimentos de origen animal y moluscos (Dabeka y McKenzie, 1995).

D.4.2. Metabolismo

Como un componente de la vitamina B_{12} , el cobalto es un elemento esencial y hasta ahora no se ha demostrado otro papel fisiológico en los seres humanos. El cuerpo contiene alrededor de 1-1.5 mg de cobalto presente en tejido óseo, músculo y riñón, del cual 85% es en forma de vitamina B_{12} ; los requerimientos diarios de esta vitamina son de aproximadamente 1 μg , teniendo en cuenta

que sólo el 50% es absorbida por el tracto gastrointestinal (Linnainmaa y Kiilunen, 1997; Filon y col., 2004).

La tasa de absorción depende de la solubilidad y dosis de los compuestos de cobalto en fluidos biológicos y en los macrófagos pulmonares (Harding, 1950; Rhoads y Sanders, 1985; Lison y col., 1995); estudios con hámster mostraron que la absorción de CoO a 5 mg fue del 0.5%, mientras que la absorción a la misma dosis pero de ClCo_2 en ratas fue de 30% (Comar y Davis, 1947; Carlberger, 1961; Taylor, 1962). Las principales vías de exposición son la respiratoria y la gastrointestinal en la cual (Scansetti y col., 1994; Linnainmaa y Kiilunen, 1997; Filon y col., 2004;) es mucho mayor ya que puede tener transportadores a fines como el hierro y el níquel, cuando existe deficiencia de hierro, aumenta la absorción de cobalto y su unión a grupos SH reduce su absorción (Schade, 1970); una vez absorbido el cobalto, es transportado sistemáticamente unido a la albúmina y posteriormente tiende a concentrarse mayormente en riñón e hígado y en menor proporción en las glándulas suprarrenales (Smith y col., 1972; Domingo, 1989).

El cobalto no se acumula en el organismo por lo que es eliminado rápidamente del cuerpo a través de la orina pero una cierta proporción (10%) tiene una semivida biológica de 2-15 años; después de la administración intravenosa de cloruro de cobalto en ratas, el 10% de la dosis se excreta en las heces, lo que indica que el cobalto también se puede secretar en la bilis (Kent y McCance, 1941).

D.4.3. Mecanismo de toxicidad

La biodisponibilidad de los iones Co (II) es relativamente limitada ya que estos cationes precipitan en presencia de fosfatos y no muy específicamente se unen a las proteínas como la albúmina (Kadiiska y col., 1989).

D.4.4. Efectos sobre la salud

El cobalto tiene funciones importantes en el organismo, ya que participa en la maduración y el crecimiento celular pues forma parte de la vitamina B₁₂ que permite activar la síntesis la eritropoyetina para la formación de eritrocitos, además interviene como cofactor de la enzima glicina dipeptidasa que es fundamental para la formación de ácidos biliares

La exposición a niveles altos de cobalto puede producir efectos en los pulmones y el corazón; también puede producir dermatitis, sobre todo por la exposición a tintes para cabello, cremas y la utilización de fertilizantes con este metal (Marcussen, 1963; Raben y col., 1966; Camarasa, 1967). Se ha demostrado que las sales solubles de este metal pueden causar toxicidad severa de las vías respiratorias como la degeneración y metaplasia escamosa del epitelio olfativo e inflamación en nariz y laringe en ratas y ratones expuestos a la inhalación de sulfato de cobalto (Bucher y col., 1990). De acuerdo a Coates y Watson (1971), en humanos causa rinitis alérgica y asma . Los grandes bebedores de cerveza contienen altas concentraciones de cobalto ya que se utiliza como espumante; algunos estudios con personas mostraron efectos como la insuficiencia cardíaca y de tiroides (Alexander, 1972). Estos efectos adversos se consideran reversibles y probablemente reflejan la inhibición de la tirosina iodinasa por los iones de cobalto (II) Novikova (1964)

La exposición a altas cantidades de radioactividad emitida por el cobalto puede dañar las células en el cuerpo, causar esterilidad y pérdida de pelo, aunque también se puede sufrir el síndrome de radiación aguda que incluye náuseas, vómitos, diarrea, hemorragia, coma y aun la muerte; ésta radiación es algunas veces usada en pacientes con cáncer para destruir tumores, por lo que es común que padezcan estos síntomas (Jensen y Tuchsén, 1990; Léonard y Lauwerys, 1990; Lison y col., 2001; IARC, 2003).

IV. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día las alteraciones a la salud del ser humano son causadas por la alta concentración de metales pesados provenientes del medio ambiente y que llegan a incorporarse en los alimentos mediante el uso de fertilizantes, durante su recolección, su transporte e industrialización, provocando que de esta manera los metales puedan llegar al ser humano, en donde pueden bioacumularse y causar daños en el organismo, siendo el sistema gastrointestinal el más afectado a nivel tisular y celular; por tal motivo es necesario llevar a cabo un estudio a nivel celular que permita evaluar el daño citotóxico del sulfato de plomo, cloruro de cobalto, cloruro de cadmio y pentóxido de arsénico en el intestino delgado, ya que no se ha reportado el daño que estos compuestos pueden causar en este tipo de células.

HIPÓTESIS

Los metales pesados tales como plomo, cobalto, cadmio y arsénico pueden ocasionar daño citotóxico sobre las células epiteliales del intestino delgado.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el daño citotóxico de plomo, cadmio, cobalto y arsénico en células epiteliales de intestino delgado en ratas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✚ Evaluar el efecto citotóxico de plomo, cadmio, cobalto y arsénico mediante cultivo primario de células epiteliales de intestino delgado y en fragmentos de intestino delgado de rata macho Wistar.
- ✚ Determinar la concentración inhibitoria 50 (DI50), a partir de curvas dosis-efecto, debido al daño citotóxico causado por plomo, cadmio, cobalto y arsénico, en células epiteliales de intestino.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

A.1. Reactivos

- Cloruro de cobalto de J.T.Baker (México)
- Cloruro de cadmio de J.T.Baker (México)
- Sulfato de plomo de J.T.Baker (México)
- Pentóxido de arsénico de J.T.Baker (México)
- Fosfato monobásico de potasio de J.T.Baker (México)
- Fosfato dibásico de potasio de J.T.Baker (México)
- Cloruro de sodio de Química Meyer (México)
- Cloruro de potasio de J.T.Baker (México)
- Carbonato de sodio de Química Meyer (México)
- Hidróxido de potasio de J.T.Baker (México)
- Dextrosa de J. T. Baker (México)
- Azul tripán 0.05% de Gibco (Nueva Zelanda)
- Tritón Sigma-chemical (USA)
- Tripsina Sigma-chemical (USA)
- Estreptomina de HyClone (USA)
- Medio Mc Coy 5^a modificado de Gibco (Nueva Zelanda)
- Suero fetal bovino de Gibco (Nueva Zelanda)

A.2. Material biológico

- Ratas Wistar macho (190-250 g)

B. MÉTODOS

B.1. Preparación de las soluciones de metales

Para la preparación de las soluciones de metal, se utilizó medio de cultivo completo (MCC), el cual incluía; medio Mc Coy 5A modificado, Suero fetal bovino 5% y estreptomycin 1.5%) y se mantuvieron en previa refrigeración, a continuación en la tabla 1 y 2 se muestran las concentraciones preparadas para cada metal.

Metal	Concentración $\mu\text{g/mL}$										
Pb	0	25	50	75	100	125	150	175	200	225	250
Co	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450	
Cd	0	250	500	750	1000	1250	1500	2000			
As	0	1	5	10	25	50	100	200			

Tabla 2.- Concentraciones utilizadas de cada metal para medir la viabilidad celular mediante la técnica de Frotis.

Metal	Concentración $\mu\text{g/mL}$										
Pb	0	0.5	1	2.5	5	7.5	10	25	50	100	
Co	0	10	50	75	100	200	300	400	450		
Cd	0	1	5	10	25	50	100	250	500		
As	0	1	2.5	5	7.5	10	25	50			

Tabla 3.- Concentraciones utilizadas de cada metal para medir la viabilidad celular mediante el estudio de células libres.

B.2. Estudio de citotoxicidad de Pb, Co, Cd y As en las células de intestino delgado mediante la técnica de Frotis.

B.2.1. Obtención del intestino

Se emplearon 3 ratas Wistar-macho en previo ayuno de 24 horas y agua *ad libitum* para cada ensayo; los animales fueron sacrificados y trasladados a la cámara de bioseguridad donde se expusieron ventralmente, se realizó un corte en el abdomen para extraer el intestino delgado, el cual fue cortado en segmentos de 2 cm aproximadamente; cada fragmento fue invertido para exponer la mucosa intestinal utilizando aplicadores de madera, se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS: 10 mM, pH 7.4, 0.9% de NaCl), seguido de una solución de tritón en PBS y por último con una solución isotónica con estreptomycin al 1.5%; posteriormente los segmentos de intestino se introdujeron en un tubo con 8 mL de medio de MCC, manteniéndose en incubación a 37°C; parte de los segmentos de intestino se utilizaron para realizar la prueba de viabilidad celular mediante la técnica de frotis, mientras la otra parte se utilizó para liberar células.

B.2.2. Estudio de Viabilidad celular mediante la técnica de Frotis

Los fragmentos de intestino, obtenidos como se menciona en el apartado anterior, fueron expuestos a diferentes concentraciones de cada metal, como se indica en la Tabla 2, se incubaron durante 15 min en ambiente de CO₂ al 4% a 37°C; transcurrido el tiempo de exposición cada trozo de intestino fue retirado de la solución de metal y se realizó un frotis de células presionando y deslizando ligeramente el tejido sobre un portaobjetos, se tiñeron con azul tripán (0.05 %) con la finalidad de teñir las células que fueron dañadas por el metal (las células dañadas se tiñen en color azul), se colocó el cubreobjetos

para observar al microscopio óptico y se realizó un conteo de 100 células totales determinando el número de células vivas y dañadas; los resultados fueron reportados como porcentaje de células vivas (viabilidad celular).

B.3. Estudio de citotoxicidad de Pb, Co, Cd y As mediante cultivo primario de células epiteliales de intestino delgado de rata-Wistar.

B.3.1. Liberación de las células

Fragmentos de intestino obtenidos como se indica en el apartado B.2.1 fueron colocados en un tubo estéril que contenía 4 mL de tripsina bovina al 0.25 % e incubados a 37°C por 30 min con el fin de activar a la tripsina y liberar a la células del tejido, una vez transcurrido el tiempo de incubación, los fragmentos de intestino fueron retirados del tubo dejando a las células liberadas, se centrifugaron por 15 minutos a 2500 rpm para sedimentar a las células y eliminar los restos de tripsina, a continuación se sometieron a una serie de 3 lavados en medio Mc Coy y finalmente ser resuspendidas en 5 mL MCC; se realizó el conteo de las células al microscopio empleando una cámara de Neuvauer.

B.3.2. Estudio de viabilidad celular mediante células libres

Se realizó una dilución con respecto al número de células obtenidas en el párrafo anterior, para sembrar un número conocido de células; de la dilución preparada se tomaron alícuotas de 750 µL, se agregaron 750 µL de las diluciones de metales previamente preparadas (tabla 3), se incubaron en ambiente de CO₂ (4%) a 37°C por 15 min, a continuación se tomó una alícuota de la suspensión celular, se tiñó con azul tripán al 0.05 % y se realizó el conteo de células vivas al microscopio óptico con ayuda de un hematocitómetro. Los

resultados se reportaron como porcentaje de viabilidad celular y como número total de células que no sufrieron daño por efecto de los metales.

B.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS Plus 4.0, realizándose ANOVA y la prueba de Tukey a una $\alpha=0.05$.

VII. RESULTADOS

A. ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS EPITELIALES DE INTESTINO DELGADO EN RATAS WISTAR-MACHO.

A.1. Arsénico

En el estudio de citotoxicidad utilizando la técnica de frotis, mostrado en la Figura 1, se observa que el efecto causado por el arsénico presenta una relación directa entre la viabilidad y la concentración del metal ya que la viabilidad disminuye al aumentar la concentración; siendo mayor la disminución en el rango de 1 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, obteniéndose una viabilidad del 50% a la concentración de 12.54 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 4).

Para el estudio de cultivo primario de células, los resultados se muestran en la Figura 1, en donde se observa que hay una disminución drástica en la viabilidad celular entre las concentraciones de 1 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, decayendo en este punto a un 44.23 % y volviendo a descender ligeramente hasta un 28.23 % a la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y resultando una dosis inhibitoria media de 8.392 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que se observa en la Tabla 4.

A.2. Cadmio

En la Figura 2, se observa el efecto citotóxico ocasionado por cadmio en el ensayo de frotis y células libres, donde se aprecia que para el estudio de frotis existe una disminución en la viabilidad entre las concentraciones de 250 a 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, disminuyendo de 75.3 hasta 25 % y determinándose que la dosis a la cual disminuye la viabilidad al 50% fue de 1079.919 $\mu\text{g}/\text{mL}$, valor que se observa en la Tabla 4. Por otro lado los resultados del estudio de cultivo primario (células libres), también mostrado en la Figura 2 se indica que el

efecto citotóxico causado por el cadmio ocasiona que la viabilidad disminuya rápidamente entre las concentraciones 1, 5 y 10 µg/mL, lo que es equivalente a un 63% de daño celular y manteniéndose constante entre 25 y 250 µg/mL, determinándose la DI_{50} a la concentración de 171.066 µg/mL (Tabla 4).

A.3. Cobalto

El efecto citotóxico causado por el cobalto en frotis, se muestra en la Figura 3, en donde se observa que en el rango de 50 a 200 µg/mL la viabilidad decae en un 31.49% y posteriormente descendiendo paulatinamente hasta alcanzar la dosis inhibitoria 50 a la concentración de 375 µg/mL (Tabla 5) sin observarse cambios considerables en la viabilidad, lo que infiere que este metal no es muy toxico para este tipo de células.

Con respecto al estudio de cultivo de células libres, mostrado en el Figura 3, se observa que la viabilidad celular disminuye considerablemente entre las concentraciones de 10 a 50 µg/mL hasta 49.78%, obteniéndose a 51.65 µg/mL el 50 % de la viabilidad celular (Tabla 5) y continuando el descenso hasta 22.02 % a 450 µg/mL.

A.4. Plomo

En la Figura 4 se presentan los resultados del efecto citotóxico causado por el plomo en fragmentos de intestino, donde se observa que al aumentar la concentración la viabilidad disminuye, ya que entre las concentraciones 25 a 100 µg/mL la viabilidad decae el 52.17 %, disminuyendo la viabilidad celular en un 50 % a 91.033 µg/mL (Tabla 5), sin embargo a partir de 125 µg/mL el descenso en la viabilidad es más lento, lográndose llegar a 33.3 % a la máxima concentración probada de 250 µg/mL. Así mismo en la Figura 4 se muestran

los resultados del estudio de citotoxicidad causado por el plomo en las células libres, en donde se observa que la viabilidad disminuye en un 56.12 % a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, determinándose a 8.048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la dosis inhibitoria media, valor que se observa en la Tabla 5 y llegando a una viabilidad celular de 29.52 % a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En la Figura 5 se presenta la comparación por concentraciones entre arsénico, cadmio y plomo, en donde se observa que a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre metales, pero a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el cadmio presentó diferencia significativa con respecto a plomo y arsénico, los cuales tuvieron similar nivel de toxicidad, sin embargo al aumentar la concentración a 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ambos metales continuaron siendo iguales estadísticamente y presentando mayor grado de toxicidad que el cadmio.

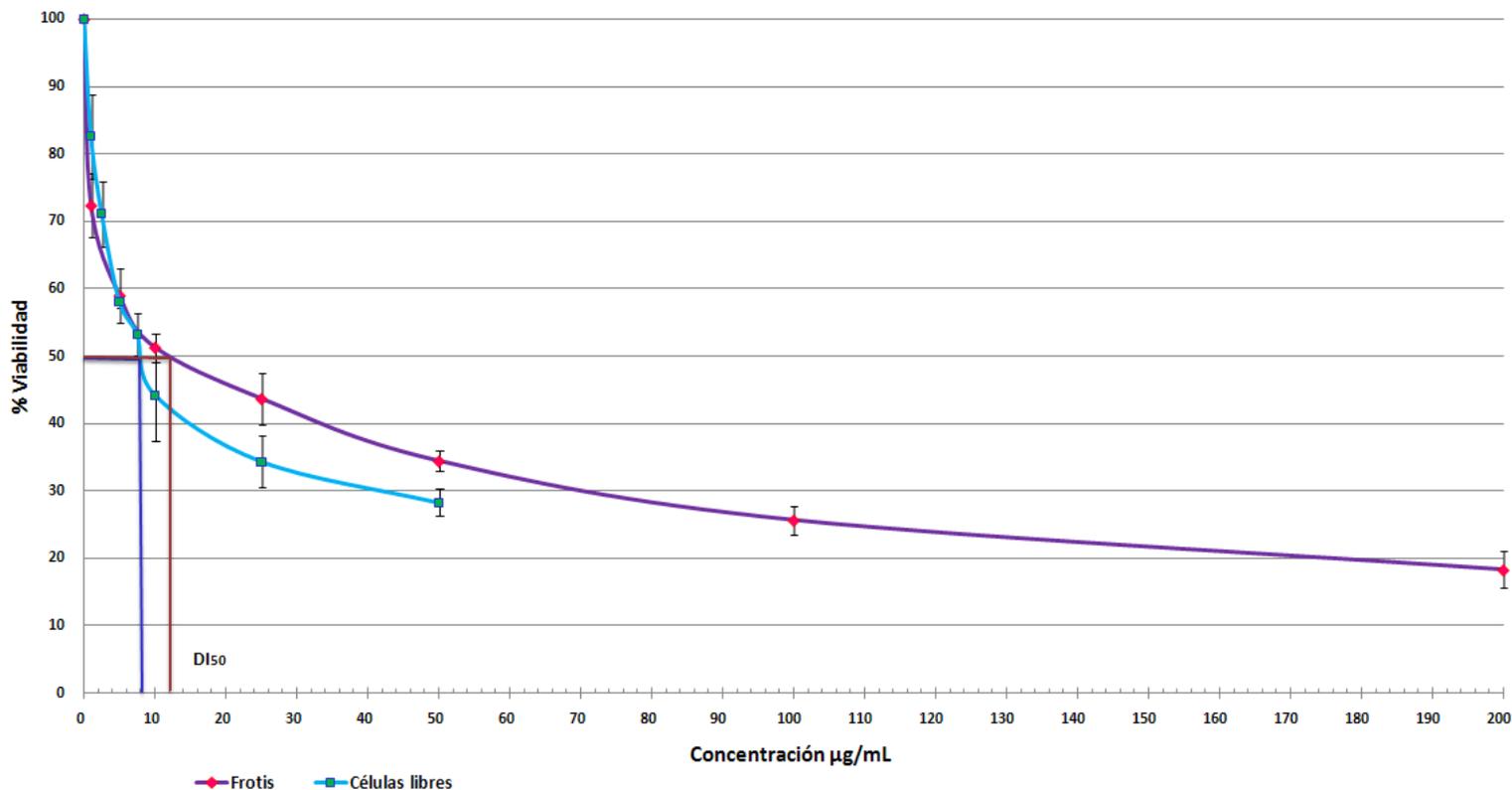


Figura 1. Efecto citotóxico del arsénico en frotis y células libres

Para el estudio de frotis , los segmentos de intestino fueron incubados por 15 min con las diversas concentraciones mostradas en la figura y después se deslizaron sobre un portaobjetos y se tiñó con azul tripán, realizándose el conteo al microscopio óptico ($D_{150}=12.538 \mu\text{g/mL}$). Para células libres , se tomó una alícuota de 750 μL de una concentración conocida de células y se colocaron con 750 μL de la solución de metal, se incubó por 15 min y se determinó el número de células vivas en un hematocitómetro ($D_{150}=8.392 \mu\text{g/mL}$).

METAL	DI₅₀ Frotis (µg/mL)	DI₅₀ Células libres (µg/mL)
As	12.538	8.392
Cd	1079.919	171.067

Tabla 4. Dosis inhibitoria media para el estudio de frotis y células libres en arsénico y cadmio

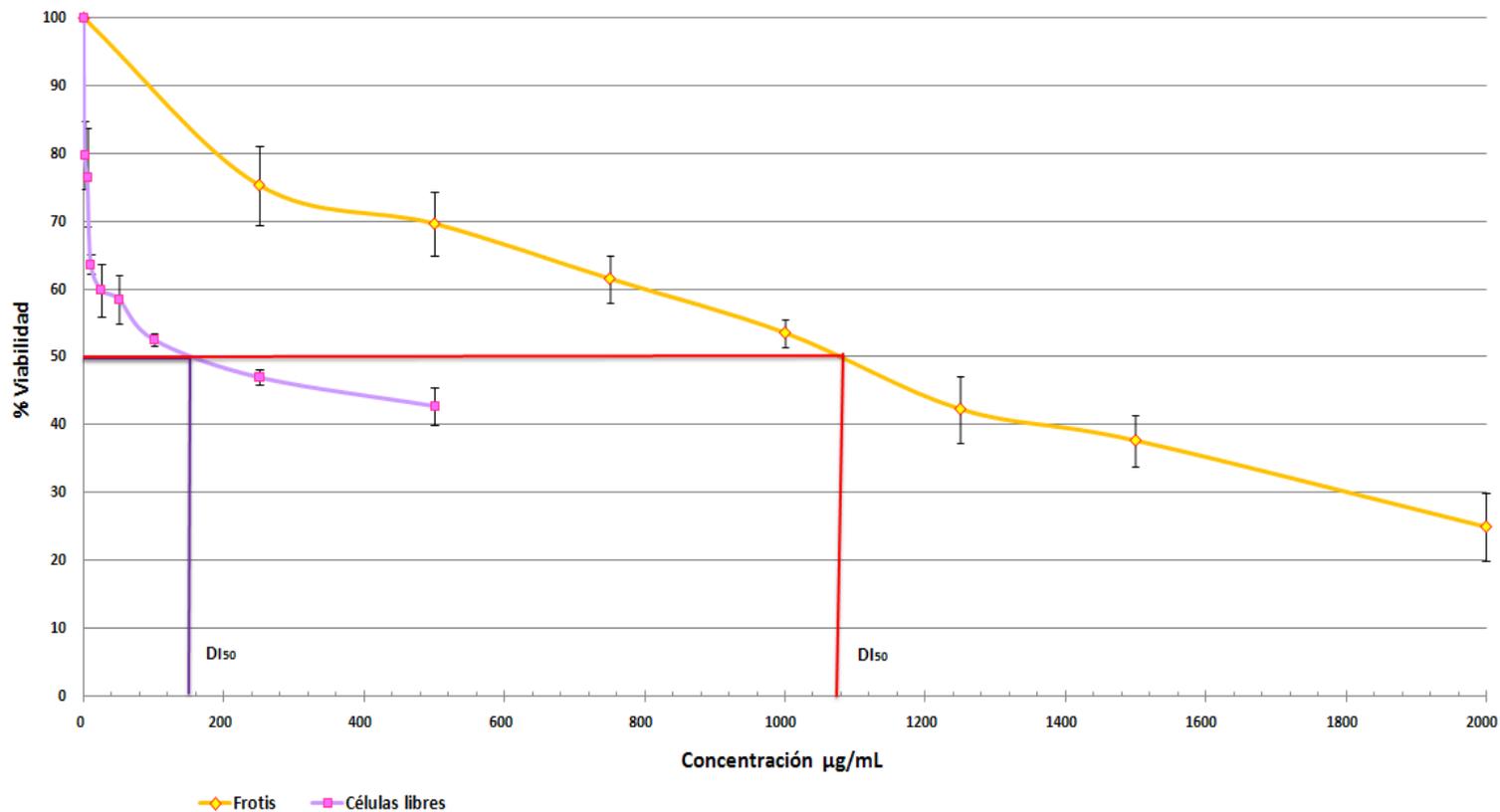


Figura 2. Efecto citotóxico del cadmio en frotis y células libres

Para células libres  a partir de un cultivo celular primario, se tomaron 750 µL de células, se incubaron por 15 min con las concentraciones mostradas en la figura y se determinó el número de células vivas empleando un hematocitómetro (DI=171.07 µg/mL); para el estudio en frotis  , se incubó el segmento de intestino junto con la solución de metal por 15 min y posteriormente se realizó un frotis sobre un portaobjetos, se tiñó con azul tripan y se determinó la viabilidad celular al microscopio óptico (DI=1079.919 µg/mL).

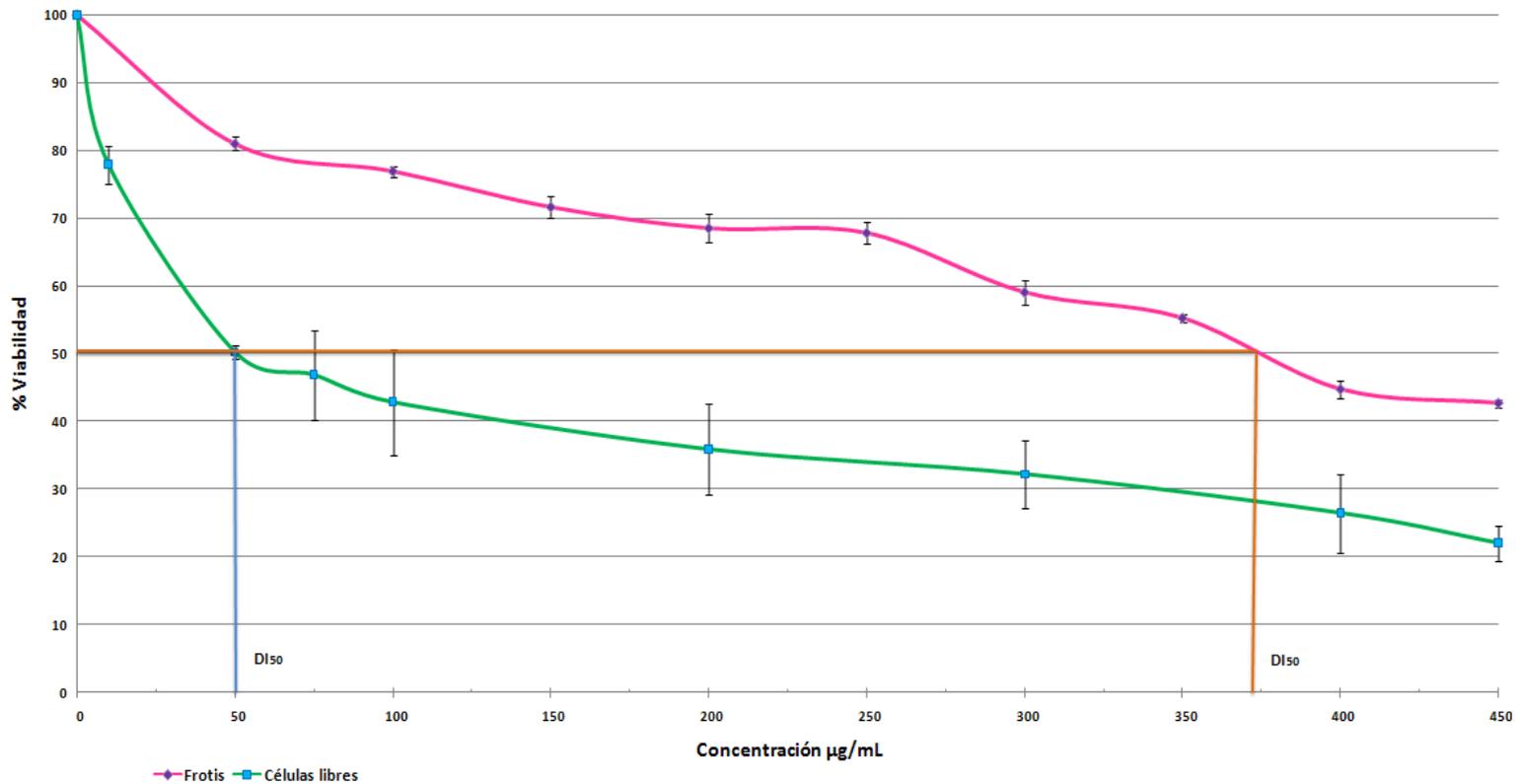


Figura 3. Efecto citotóxico del cobalto en frotis y células libres

Para el estudio de frotis se incubaron los trozos de intestino con las concentraciones (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450) $\mu\text{g/mL}$ de cobalto por 15 min y se realizó un frotis en un portaobjetos, se tiñó con azul tripán y realizando el conteo al microscopio, para el estudio con células libres se colocó una solución conocida de células y se incubó con las concentraciones (10, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 450) $\mu\text{g/mL}$ por 15 min y se realizó el conteo al microscopio óptico.

METAL	DI₅₀ Frotis (µg/mL)	DI₅₀ Células libres (µg/mL)
Pb	91.033	8.0485
Co	375	51.6467

Tabla 5. Dosis inhibitoria media para el estudio de frotis y células libres en cobalto y plomo

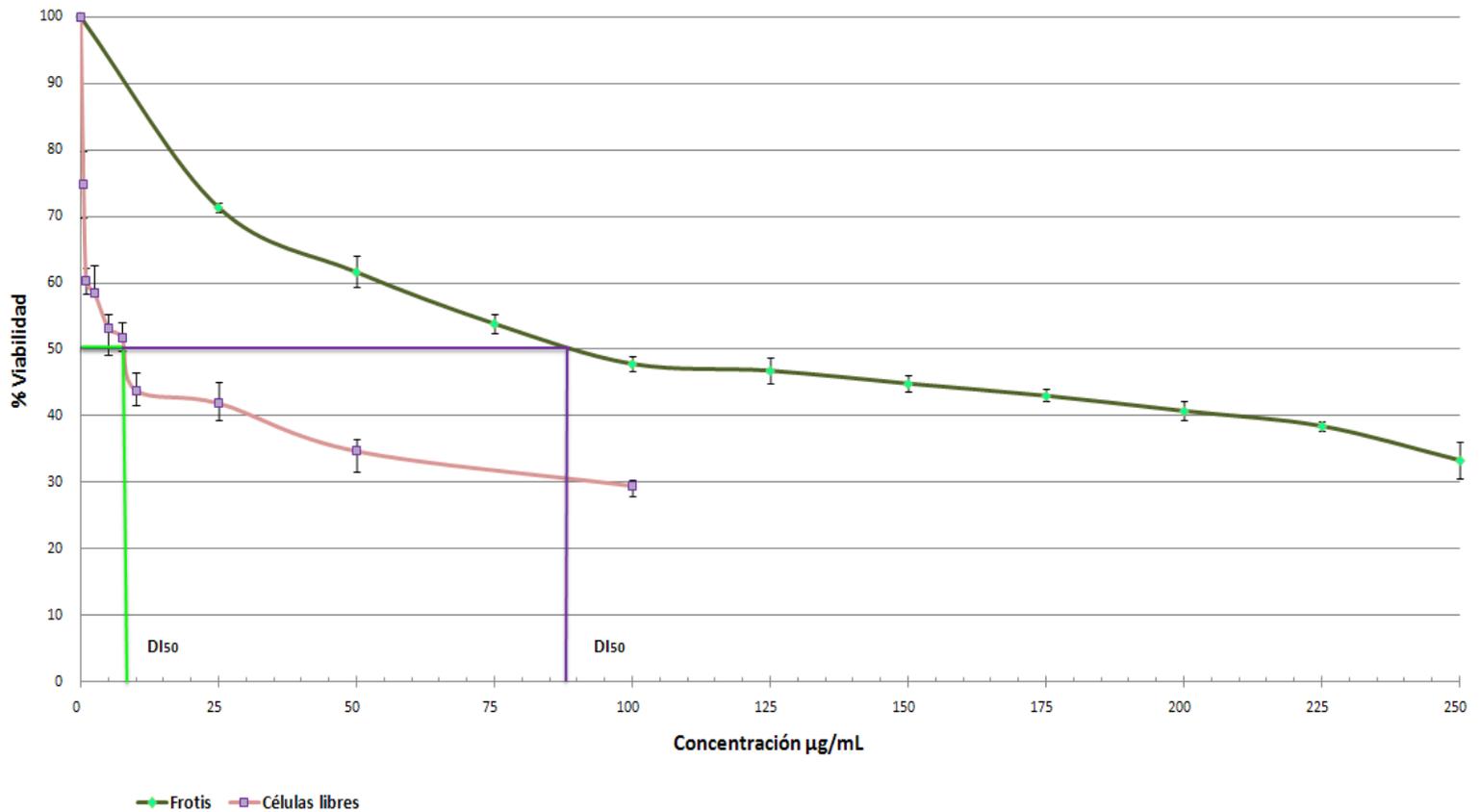


Figura 4. Efecto citotóxico del plomo en frotis y células libres

Para el estudio con frotis se incubaron los segmentos de intestino con las concentraciones de plomo mostradas en la figura por 15 min, posteriormente se realizó el conteo haciendo un frotis sobre un portaobjetos determinando la viabilidad celular por técnica exclusión empleando azul tripán y observando las células vivas al microscopio; para el estudio con células libres, a partir de una solución conocida de células se incubaron, junto con cada concentración de metal, por 15 min y el conteo se realizó al microscopio óptico utilizando un hematocitómetro.

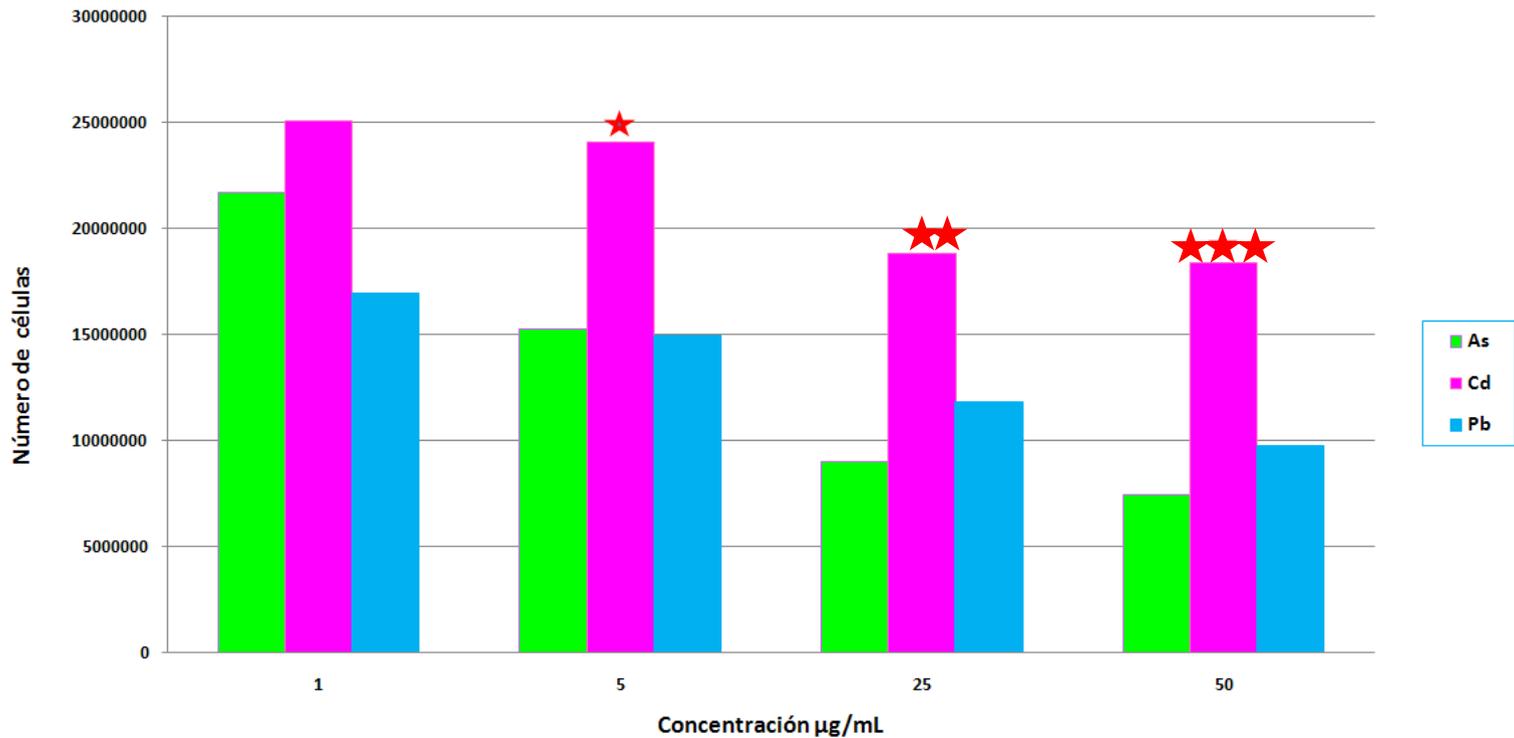


Figura 5. Comparación de muestras por concentración de arsénico, cadmio y plomo.

Comparación por concentración entre Arsénico, Cadmio y Plomo sobre el número de células libres una $\alpha=0.05$ empleando la prueba de Tuckey en el programa estadístico Statgraphics versión 4.

- ★ Indica diferencia estadística significativa entre metales a la concentración de 5 µg/mL.
- ★★ Indica diferencia estadística significativa entre metales a la concentración de 25 µg/mL.
- ★★★★ Indica diferencia estadística significativa entre metales a la concentración de 50 µg/mL.

VIII. DISCUSIONES

La ingesta constante de alimentos con elevados contenidos de arsénico, cadmio, cobalto y plomo pueden ser perjudiciales para la salud ya que se ha demostrado que causan daño en las células del intestino delgado en donde se lleva a cabo la absorción de nutrientes y otras sustancias.

En el estudio realizado con los diversos metales en frotis de células de intestino, la viabilidad disminuye al aumentar la concentración de cada metal, sin embargo la viabilidad celular fue más alta en comparación con el estudio realizado en células libres; el efecto observado se debe a que en el estudio de frotis las células se encuentran protegidas por la mucosa intestinal y el tejido, mientras que las células libres se encuentran desprotegidas y más expuestas a los metales.

Lee y Ho (1994) realizaron un estudio utilizando células de ovario de hámster chino (CHO) y fibroblastos humanos (CL3R), donde se probó el efecto citotóxico del arsenito sódico y se obtuvo que este puede inducir daño oxidativo en ambas líneas celulares, sin embargo las células CHO fueron mucho más resistentes que los fibroblastos humanos a la toxicidad del metal, obteniéndose para células de ovario una dosis inhibitoria media de 3.688×10^6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para fibroblastos humanos 1.475×10^6 $\mu\text{g}/\text{mL}$; la resistencia de las células CHO fue posiblemente debido a un aumento de la actividad hemo oxigenasa que induce una respuesta general al estrés oxidante en células de mamíferos (Applegate y col., 1991) deduciendo así que la diferencia de toxicidad por arsénico en células humanas y animales es que el metal causa una mayor daño oxidativo en las primeras, sin embargo este fenómeno también podría deberse a las diferencias metabólicas entre los seres humanos

y animales de experimentación como lo son; el transporte de membrana, la inducción de proteínas al estrés y el retraso de la progresión del ciclo celular (Tam y col., 1979; Lee y col., 1989), ya que los mecanismo de resistencia son variables entre cada especie respectivamente.

Ensayos de citotoxicidad con trióxido de arsénico en líneas celulares humanas utilizando células endoteliales microvasculares (HMEC), melanocitos (CRL1675), células dendríticas (THP-1 + A23187), queratinocitos (HaCaT), fibroplastos (CRL1904), monocitos (THP-1) y células T (Jurkat), se obtuvieron valores de DL₅₀ de 0.48, 1.5, 1.5, 9, 37, 50 y 50 µg/mL respectivamente, estos datos indican que el arsénico es citotóxico para las 7 líneas celulares de la piel, siendo las células endoteliales microvasculares las más sensibles al As₂O₃, mientras que las células endoteliales microvasculares y células T mostraron mayor resistencia (Graham y col., 2003); comparando con los valores obtenidos en este estudio con células epiteliales de intestino delgado la DL₅₀ fue de 8.392 µg/mL para células libres y 12.538 µg/mL para frotis de intestino, siendo éstas mucho más resistentes que los melanocitos, las células dendríticas y endoteliales microvasculares debido a que cada tipo de células tiene una estructura y función diferente. La exposición al arsénico con frecuencia se traduce en cáncer de piel los efectos tóxicos se intensifican mediante la inhibición de la reparación del ADN, el cambio de potencial redox celular y la alteración del ciclo celular de las proteínas de control (Gradecka y col., 2001).

Estudios *In vitro* realizados en 20 líneas de células cancerosas de rata Wistar empleando As₂O₃ (Li y Broome, 1999) demostraron que este compuesto causa toxicidad a concentraciones mayores de 5 µg/mL, ocasionando necrosis aguda incluyendo células de leucemia, sin embargo a una concentración inferior (0.5-5 µg/mL) bloquea la proliferación de líneas celulares de leucemia,

deteniendo la proliferación de las células en mitosis y previene que las células entren en telofase; en otro estudio similar se utilizaron células cancerosas de próstata (DU145 y PC-3) y ovario (MDAH 2774), mediante la técnica de MTT (Ruchan y col., 2000), en donde se determinó que a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de As_2O_3 más del 50 % de las células murieron en ambas las líneas celulares después de 72 h de exposición; en comparación con el estudio realizado en el presente trabajo se utilizaron células epiteliales normales de intestino delgado donde se corroboró que As_2O_5 causó efecto tóxico en las células epiteliales normales la concentración de 8.392 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el estudio de células libres, daño que se debe, de acuerdo a Li y Chou (1992), a que afecta a las enzimas mitocondriales y perjudica la respiración de los tejidos, alterando el ciclo de Krebs e interrumpiendo la fosforilación oxidativa. Por otro lado la diferencia entre los estudios anteriormente mencionados se puede deber al tipo de compuesto utilizado pues el As_2O_3 es más tóxico que el As_2O_5 (Braman y Foreback, 1973) y al tipo de célula con la que se realizó cada estudio ya que las células epiteliales normales son más sensibles que las células cancerosas, demostrándose en otro estudio la inhibición de 6 líneas celulares de glioma humano (U373, U87, U251, GB1, A-172, y T98G), calculándose la DL_{50} de As_2O_3 para todas las líneas de células tumorales entre las concentraciones 178.058 y 366 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Kanzawa y col., 2003). En otro estudio realizado por Sezgin y col. (2002) probaron de igual manera la toxicidad del As_2O_3 en células malignas de mama (MCF-7), obtuvieron una DL_{50} de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por lo que se puede deducir que las células de glioma humano son más susceptibles al trióxido de arsénico que las células de MCF-7; aunque se ha sugerido que el As_2O_3 induce apoptosis en las células anteriormente mencionadas, no ha de extrañar que también pueda ocasionarlo en otras células al momento de su exposición, ya que en el presente estudio se demostró que el As_2O_5 causa daño citotóxico en células epiteliales normales a concentraciones mucho más bajas de las que se utilizaron en los estudios de

células cancerosas y de glioma humano y de cáncer de mama. La sensibilidad marcada entre células normales y células cancerosas se debe a la diferencia de funciones y estructura, pues muchas de las características de las células cancerosas se deben a defectos en el control genético de la división celular; no demuestran inhibición por contacto, mientras la mayoría de las células normales pueden sentir si están siendo "apiñadas" por las células vecinas (inhibición por contacto), las células cancerosas ya no responden a esta señal de alto, el crecimiento continuo resulta en el amontonamiento de las células y la formación de una masa de tumor que le permite mayor resistencia a sustancias extrañas. Además el mecanismo de defensa entre células normales y cancerosas es variable, pues las células cancerosas se reproducen descontroladamente y producen enzimas que les permiten degradar a otras células y tejidos, cambiando el citoesqueleto de la célula creando filamentos proteicos que permiten una mayor resistencia a la célula cancerosa; llevan a cabo también la producción de diversas proteínas que realizan funciones diferentes en comparación a una célula normal y que dirigen ciertas acciones celulares especializadas como la producción de diversos genes o proteínas como la MDR (multiresistencia a las drogas) que actúa como una bomba localizada en la membrana de las células que es capaz de sacar selectivamente a moléculas que se encuentran dentro de las células, incluyendo los fármacos quimioterapéuticos y siendo inefectivos. Las proteínas bcl-2 (gen de linfoma de célula B) se encuentran asociadas con las membranas y su actividad, ya que consta de un sistema complejo de señalamiento que controla la apoptosis en células que están dañadas, pudiendo llevar a una división continua de las líneas de células mutadas (Emory University2008).

Sin embargo, la toxicidad del arsénico depende de su forma química siendo la metilación una reacción importante en el metabolismo de arsénico en el hombre en la mayoría de los animales de experimentación; ácido

metilarsénico (MAA) y el ácido dimetilarsénico (DMAA) han sido identificados como metabolitos orgánicos en orina humana después de la ingestión de arsénico inorgánico ya sea en estado trivalente o pentavalente. Tchounwou y col. (2002), realizaron un estudio con células de carcinoma de hígado humanas (HepG2) donde se evaluó la citotoxicidad mediante el ensayo MTT, después de la exposición a trióxido de arsénico y el ácido metanoarsenito monosódico (MSMA); la citotoxicidad fue evaluada para la viabilidad celular y obteniéndose los valores para DL50 de 11.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para As_2O_3 y de 257.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en MSMA, lo que indica que el primero es 20 veces más tóxico que el segundo reduciendo la viabilidad de células de carcinoma hepático, sin embargo comparando con los resultados obtenidos en el presente estudio el As_2O_5 fue más tóxico con respecto a As_2O_3 y MSMA. Estos resultados están en acuerdo con los de estudios previos que indican que diversas especies de arsénico tienen diferentes grados de toxicidad, pues el efecto tóxico es a través de alteraciones de la respiración celular por la inhibición de las diferentes enzimas mitocondriales, la capacidad de interactuar con los grupos sulfhidrilo de proteínas y enzimas y para sustituir el fósforo en una gran variedad de reacciones bioquímicas (ATSDR, 1993).

Estos resultados en gran medida apoyan la hipótesis de que la toxicidad de compuestos de arsénico es altamente dependiente de sus formas químicas siendo las formas inorgánicas más tóxicas que las orgánicas, además de existir en diferentes formas o estados de valencia, varios estudios han demostrado que la toxicidad del arsénico depende de la dosis de exposición, frecuencia y duración, especies biológicas, edad y género, así como sobre la susceptibilidad individual, genética y factores nutricionales (IARC, 1987; ATSDR, 1999 y Tchounwou y col., 1999).

La técnica de MTT es una prueba muy sensible para determinar muerte celular en diversos tipos de células, pero debido a que en este estudio se utilizaron células epiteliales de intestino delgado, no fue posible que las células se adhirieran a la superficie de las microplacas, al ser incubadas en un ambiente de CO₂ y debido al origen de estas células, existe una gran cantidad de bacterias de manera natural las cuales no se pueden erradicar sin que se ocasione un daño a las células epiteliales, lo cual hizo imposible emplear esta técnica. Sin embargo existen estudios empleando células de carcinoma renal (RCC) de humano en donde determinaron la toxicidad del trióxido de arsénico mediante la técnica de MTT, observaron que este inhibió el crecimiento celular y causó apoptosis en una forma dependiente de concentración, ya que partieron de una concentración de 98.921 µg/mL donde se presentó una inhibición del 27.6 % mientras que a la concentración de 791.368 µg/mL la inhibición fue del 50.77 % (Qu y col., 2004); en un estudio similar, donde se trabajo con células cancerosas de estomago (MKN45), los resultados indicaron que el As₂O₃ ocasionó una inhibición celular de 38.5, 99.1 y 99.5 % a las concentraciones 197.842x10³, 989.21x10³ y 197.842x10⁴ µg/mL respectivamente y calculándose una DL50 de 1.3583x10⁶ µg/mL, lo que indica que el efecto citotóxico de As₂O₃ era menor que en otras líneas celulares cancerosas (Shao y col., 2005), de acuerdo a algunos autores (Lecureur y col., 2002, Hu y col., 2003 y McCafferty-Grad, 2003) las mitocondrias juegan un papel importante en la apoptosis inducida por el arsénico pues As₂O₃ provoca el colapso del potencial de membrana mitocondrial y posteriormente su ruptura y la liberación de citocromo c al citosol participar en la inducción de la apoptosis. Por consiguiente se puede deducir que células epiteliales normales de intestino delgado son más sensibles al arsénico que las células de carcinoma renal y células de carcinoma gástrico.

Estudios *In vivo* han demostrado que el As_2O_3 puede causar apoptosis en células hepáticas a partir de una dosis de 1 mg/kg, mientras que a una dosis de 5 mg/kg produjo necrosis, pues se observó que el núcleo celular estaba roto pero encapsulado, además de causar reacción inflamatoria y daño al epitelio del túbulo renal (Wang y col, 2003).

Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la forma trivalente de los de metilados del arsénico son altamente tóxicos para una gran variedad de tejidos e influye en la inducción de cáncer en seres humanos y en modelos animales (Cohen et al., 2006) pues en estudios realizados por algunos autores (Wei y col., 2002; Cohen y col., 2007) utilizando ratas macho Wistar las cuales se les dio arsenito en su alimento y en el agua de consumo por 2 años, los resultados mostraron la incidencia de tumores vesicales a dosis de 50 y 200 ppm en ratas que adquirieron al arsénico en agua, mientras aquellas que lo consumieron en su alimento fue notable aumento significativo de hiperplasia a 40 ppm y tumores a los 2 y 10 ppm; tal efecto fue causado por el mecanismo de desintoxicación del propio organismo, pues la forma trivalente como pentavalente del arsénico son transformadas en DMA III y DMA V (Vasken y Aposhian, 2005) que de cierta manera causa un menor efecto en el organismo, pues los recientes hallazgos *in vivo* han revelado que tanto DMA III y DMA IV ejercen efectos sobre la división celular y causar cáncer de vejiga urinaria en células de pulmón (V79) de hámster chino en un rango de dosis de 10 a 1×10^4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Eguchi y col, 1997). Dado que en un estudio *In vitro* se observó daño en células, tanto libres como en el tejido, se podría deducir que si se realizara el estudio *In vivo* mediante una administración vía intragástrica donde el As está directamente en contacto con los tejidos gastrointestinales, es probable que ejerza un efecto citotóxico sobre las células del tejido epitelial, ocasionándole daño en órganos, tejidos e inclusive cáncer.

Así mismo se han realizado estudios con otros metales, siendo el cadmio uno de los más estudiados debido a los daños que causa su exposición; por lo que en este estudio los resultados obtenidos por la exposición de cloruro de cadmio en células epiteliales normales, mostraron que para células epiteliales de intestino se necesita de mayores concentraciones de CdCl_2 para causar daño citotóxico, ya que para los ensayos de frotis en intestino y células libres la DI_{50} calculada fue de 1079.919 y 171.067 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Un estudio realizado con el mismo compuesto antes mencionado en células de fibroblastos de humano (HF2FF), se observó que el cadmio causó citotoxicidad y una disminución de la viabilidad celular del 95% a una concentración de $3.666 \times 10^3 \mu\text{g}/\text{mL}$ en un tiempo de exposición de 18 h (Mahmodabady y col., 2006), por lo tanto se puede decir que el CdCl_2 causa un mayor daño en células epiteliales normales que en fibroblastos humanos. En otro estudio con fibroblastos de ratón, se determinó que la DI_{50} del CdCl_2 fue de 293.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sin embargo, también se comprobó que la adición de MnCl_2 en un rango de $125.844\text{-}3.755 \times 10^3 \mu\text{g}/\text{mL}$ disminuye la citotoxicidad de Cd (Yanagiya y col., 2001) debido a que ambos metales tienen una ruta metabólica parecida inhibiendo el paso uno del otro de acuerdo a su concentración. En otro estudio realizado con células neuronales de ratón (HT4) tratadas con un rango de concentración entre 312.714 y $9.381 \times 10^3 \mu\text{g}/\text{mL}$ CdSO_4 , en donde la menor tasa de supervivencia se observó una disminución aproximada del 90% de la viabilidad celular después de 24 h a la máxima concentración. De acuerdo a los resultados obtenidos por Pereira y col. (2002), quienes trabajaron con células neuronales (HT4), observando que el CdSO_4 causa ruptura intracelular y un aumento del estrés oxidativo que conlleva a la inducción de una respuesta pro-inflamatoria y pérdida de la viabilidad celular.

Marcano y col. (2005) realizaron estudios con CdCl_2 y hepatocitos de ratón albino en donde después de 30 días de exposición al metal, observaron

pigmentación, caída de pelo en los animales, oscurecimiento de ojos, debilidad muscular e intranquilidad, diferencias en talla y peso a 50 ppm mientras que a 100 ppm se observaron alteraciones extracelulares como; vacuolización citoplasmática muy acentuada, dilatación de la vena central y la presencia de células binucleadas y a las 150 ppm se observaron alteraciones en los hepatocitos y el tejido mostró pérdida total de su arquitectura, vacuolización citoplasmática e infiltración linfocitaria, ya que los núcleos se presentan contraídos con la cromatina condensada, existiendo dilatación en el espacio intercelular y áreas de pérdida mitocondrial y fibrilar; por lo que los resultados obtenidos en este trabajo permiten sugerir que el cadmio ejerce un efecto citotóxico tanto en células epiteliales normales como en hepatocitos, siendo mayor el daño en las últimas probablemente como consecuencia del estrés oxidativo. Estudios *In vivo* (Korotkov y col., 1998 y Vaglio y col., 1999) sugieren que el cadmio altera la estructura de la membrana celular y mitocondrial por su efecto inhibitorio sobre la actividad de las enzimas glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y catalasa; reportando además cambios de permeabilidad de la membrana interna mitocondrial, instaurando un incremento de la permeabilidad al K^{+2} e H^{+1} . Koizumi y col. (1996), establecieron que el cadmio produce inhibición de la ATPasa dependiente de Na^{+2} y K^{+2} , originando un incremento del sodio intracelular lo cual ocasionó retención de agua e histólisis celular. Los efectos *In vivo* de cadmio son muy variados y su precisión depende de la vía de administración, respuesta biológica y de ver si los órganos desempeñan algún grado de citotoxicidad (Hayes y col., 1986; Adalis y col., 1977).

Butler y Roesijadi (2000), estudiaron la exposición del $CdCl_2$ en hematocitos de ostras y obtuvieron que a partir de una concentración $33.067 \times 10^3 \mu g/mL$ se presentó efecto citotóxico en las células; en muchos casos la especificidad del cadmio a las células parece ser mediada por la presencia de metaloproteínas

que son ricas en cisteína, las cuales secuestran e inactivan los iones libres de Cd, revocando así la toxicidad del metal (Cherian y col., 1994). Estudios realizados por Tsuzuki y col. (1994), con células ovario de hámster chino (CHO) y cloruro de cadmio utilizando la técnica de formación de colonias, obtuvieron una DI_{50} de 293.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ observándose ruptura de ADN.

Gabridge y Meccolit (1982), utilizando tejido traqueal de hámsters macho dorados, realizaron estudios de viabilidad celular utilizando CdCl_2 y basados en la actividad deshidrogenasa (ensayo con cloruro de tetrazolio) y el contenido de ATP (determinado por fotometría de luciferin-luciferase un sistema enzimático), obteniendo como respuesta una caída de 96% en la actividad ciliar traqueal evaluada por la actividad deshidrogenasa, a los 500 y 750 μM después de 48 h de exposición y reducciones en el ATP del 66%, mostrando un epitelio más delgado con una extensa vacuolización y citonecrosis, siendo la entrada del Cd dependiente del tiempo; comparado con el estudio de frotis realizado en el presente trabajo, se obtuvo que la viabilidad celular disminuye en un 50 % a una concentración de 1079.919 $\mu\text{g}/\text{mL}$, deduciendo que las células presentes en epitelio de intestino delgado son más resistentes al CdCl_2 , que las células de epitelio traqueal. Sanders y col. (1978), sugirieron que el cadmio puede alterar la permeabilidad celular al vincularse con la membrana y después entrar a la célula uniéndose a los grupos sulfidril.

Se ha observado que el CdCl_2 causa efecto citotóxico en células de hepatoma de rata (HTC) y humano (HepG2) utilizando la técnica de MTT y después de una exposición de 3 h a concentraciones mayores de 80 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente (Fotakis y Timbrell, 2006); comparando con el ensayo de células epiteliales normales, se observó daño citotóxico a los 15 min de exposición con el metal a las concentraciones de 1 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para células libres y frotis respectivamente. Así mismo se ha demostrado que el cloruro de cadmio puede llegar a causar mutagénesis en las especies *Allium sativum* y

Vicia faba a concentraciones de entre 100 y 200 µg/mL generando mutagenicidad en DNA (Unyayar y col., 2006), así como aumento en el índice del peróxido de hidrógeno lo que promueve la peroxidación lipídica de membrana (Stacey y col., 1980), así mismo en células humanas de riñón (Ad293) expuestas al mismo compuesto, se encontró que entre las concentraciones 91.65 y 183.3 µg/mL se produce mutagénesis (Misra y col., 1998), la cual se atribuye a que el Cd puede interactuar directamente con la cromatina, causando cambios en el ADN (IARC, 1993; Rossman y col., 1992; Jacobson y col., 1980), ya que puede actuar indirectamente afectando a proteínas implicadas en la transcripción, replicación o reparación del ADN (Friberg y col., 1986) y llevándose a cabo reacciones oxido-reducción que producen radicales libres que pueden romper el material genético (Rossman, 1992).

Waalkes y Diwan (1999), realizaron un estudio para determinar el efecto del cloruro de cadmio en células tumorales de pulmón (DMS 114) de humano, como resultado obtuvieron que el CdCl₂ puede inhibir la formación de tumores a partir de una concentración de 250 ppm y hasta una reducción del 45 % en su tamaño, lo que indica que este compuesto puede ser un eficaz agente antitumoral cuando se administra en dosis bajas e incluso cuando se administra después de la formación del tumor ya que en algunos casos, el cadmio puede reprimir la expresión de los genes asociados con la proliferación celular (Shimizu y col., 1997) y puede estar asociada con una detención del ciclo celular, además de que la metalotioneína es producida en menor cantidad por células tumorales lo que hace a una célula o tejido más resistente a la toxicidad inducida por el cadmio, pues esta proteína al unirse con el metal, permite su ingreso dentro de la célula (Misra y col., 1996).

El cadmio puede ser genotóxico y mutagénico en dosis altas (Waalkes 2000), más recientemente se ha demostrado que la exposición *In vitro* al cadmio puede inducir transformación de células epiteliales de próstata en humanos (Achanzar y col., 2001), los factores que pueden contribuir a la carcinogénesis inducida por el cadmio incluyen la regulación mitogénica de señalización, y la perturbación de la reparación del ADN que es consecuencia indirecta de genotoxicidad pudiendo aumentar la proliferación de las células con ADN dañado y activar proto-oncogenes.

Otro de los metales considerados como tóxico, pero en menor grado es el cobalto ya que forma parte de la vitamina B y su toxicidad depende de si solo y de su concentración como se mostró en el presente estudio, el cual fue realizado con células epiteliales de intestino delgado de rata y calculándose la DI_{50} para células libres de 51.647 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de 375 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para frotis, valores que comparados con otros estudios realizados por Allen y col. (1997), en osteoblastos humanos (SAOS-2 y MG-63) los cuales resultaron ser más resistentes al metal ya que los valores calculados para un 50 % de viabilidad en ambas líneas celulares fue alrededor de 1 mg/mL, siendo la causa de muerte la vacuolización citoplasmática; en otro estudio realizado por Nagababu y col. (2008) se determinó la viabilidad del Co III en células CHO utilizando la técnica de MTT siendo 159.1191 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la concentración que provoca una reducción del 50 % de viabilidad celular; así mismo otros autores (Hoet y col., 2002) determinaron la inhibición de la hexosa monofosfato dada por el Co en Neumocitos alveolares tipo II de rata Wistar, donde obtuvieron que a partir de una concentración de 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó estrés oxidativo y la inhibición de esta enzima que es importante para la producción de energía. Otro estudio realizado con células epiteliales alveolares tipo II, se evaluó la viabilidad celular después de 24 h, calculándose la DL_{50} a una concentración de 1100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Roesems y col. (2002) realizaron un estudio similar al anterior

utilizando macrófagos alveolares y Neumocitos tipo II (AT-II) de rata, obteniendo como resultado que los primeros son más sensibles que los segundos, ya que los a partir de los 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ los macrófagos alveolares presentaron efecto tóxico mientras que AT-II a partir de los 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo las células epiteliales normales más sensibles al CoCl_2 en comparación con neumocitos y células alveolares. También se ha demostrado que el CoCl_2 causa apoptosis en células derivadas de linfoma humano (U-937); utilizando la técnica de exclusión por tinción con azul tripán, Jun y col. (2002) determinaron que a una concentración de 183300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CoCl_2 , la viabilidad celular disminuye el 50%, sin embargo en células MG132 la concentración requerida para determinar la DL_{50} fue de 18330 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con lo que se puede deducir que ambos tipos de células son más resistentes que células epiteliales normales.

Estudios realizados con células intestinales de cáncer colorectal (Caco-2), células de queratinocitos humanos (HaCaT) y células humanas de carcinoma pulmonar (A549) se determinó la toxicidad del cloruro de cobalto a las concentraciones; 109.98×10^3 , 54.99×10^3 y 109×10^3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente observando disminución en la viabilidad en un 50 % (Bastian y col., 2009); siendo por lo tanto estos 3 tipos de líneas celulares más resistentes al CoCl_2 que las células epiteliales normales.

El plomo es un metal pesado muy tóxico, pues diversos estudios han demostrado que puede causar efectos dañinos en animales de laboratorio, diversos órganos y líneas celulares. Mahmoadabady y col. (2006) probaron la toxicidad del acetato de plomo en fibroblastos de piel humana (HF2FF), obteniendo como resultado que a una concentración de 6.505×10^3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la viabilidad celular disminuyó hasta un 95 %, valor que comparado con los obtenidos para células epiteliales normales que fueron de 91.033 y 8.0485 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en los estudios de frotis y células respectivamente, fue más elevado

siendo los fibroblastos humanos más resistentes que las células epiteliales normales. Qu y col. (2002) utilizaron células germinales de ratón (WT y MT-null) para probar la toxicidad del acetato de plomo, obteniendo como resultado una DL₅₀ de 209.81 µg/mL y 74.82 µg/mL respectivamente, por lo que este tipo de líneas celulares son más resistentes que las células epiteliales normales; estas diferencias de toxicidad se deben al tipo de células empleadas para cada estudio.

En un estudio realizado por Shin y col. (2007) *In vivo e In vitro* con ratas Sprague-Dawley, encontraron que la exposición al acetato de plomo puede provocar la actividad procoagulante en eritrocitos a una concentración de 162.65 µg/mL, mientras que una administración intraperitoneal de 10-25 mg/Kg puede ocasionar la aparición de trombos en ratas. Puesto que en los eritrocitos, el plomo puede degenerar los componentes de lípidos y proteínas (Fukumoto y col., 1983), suprime la síntesis de hemoglobina (Monteiro y col., 1989; Waldron, 1966), induce peroxidación lipídica e inhibe la superóxido dismutasa y baja el nivel intracelular de glutatión (Gurer y col., 1998; Ito y co., 1985). Se ha demostrado que el plomo puede disminuir la viabilidad celular en células de hepáticas de carcinoma humano (HepG2), ya que en un rango de concentración de 51.75x10³ a 62.16x10³ µg/mL se puede inhibir en un 50 % la viabilidad celular (Chen y col, 2002); sin embargo otros estudios realizados con la misma línea celular, pero probando la toxicidad del nitrato de plomo, mostraron los valores DL₅₀ de 49,0, 37,5 y 3,5 µg/mL para los tiempos 24, 48 y 72 h de exposición respectivamente, observándose daño en proteínas, alteración metabólica y daño en ADN; valores que comparados con los obtenidos para la dosis inhibitoria media en células epiteliales de intestino normales, las células HepG2 resultaron ser más resistentes a excepción de las que fueron tratadas con nitrato de plomo a 72 h siendo el tiempo un factor influyente en la toxicidad. Esta diferencia en la sensibilidad de las células a

este tóxico puede deberse a que cuando las células normales ya que estas no llevan a cabo bien sus funciones y por tanto tampoco pueden duplicarse, caso contrario a las células cancerosas que pueden dividirse sin recibir la señal de división, los resultados de esto son células hijas que contienen ADN anormal o hasta números anormales de cromosomas; estas células mutantes son todavía más anormales que sus células madre, de esta manera las células cancerosas pueden evolucionar a volverse progresivamente más anormales por lo que la división continua de células lleva a la formación de tumores, contribuyendo así mismo a la resistencia a fármacos observada en varios tipos de cáncer. La mayoría de estudios con plomo se centran en órganos y sistemas ya que se ha demostrado que presenta un alto grado de toxicidad, pues además induce estrés oxidativo por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la reducción del sistema de defensa antioxidante de las células. Estudios *In vivo* con ratones suizos demostraron que el acetato de plomo puede causar daños en células germinales al ser administrados vía intraperitoneal, observándose pérdida de peso testicular y la disminución en el total de espermatozoides, debido al aumento del potencial de peroxidación lipídica (LPP) de los tejidos, que funciona como un indicador de estrés oxidativo en espermatozoides de ratones (Acharia y col., 2003). También se ha demostrado que el plomo puede causar daño en ratones, Qu y col. (2002) determinaron que a partir de una concentración de 1000 ppm de acetato de plomo y una exposición de 10 semanas en el agua de bebida, se causa daño renal y la aparición de cuerpos de inclusión en riñones

Morlon y col. (2005) investigaron la toxicidad de Pb^{2+} en alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* obteniendo como resultado la disminución del 50 % en el crecimiento celular a las concentraciones de 0,15 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La toxicidad fue debido a la unión el Pb con los grupos sulfidril de proteínas, alteración de la estructura de la proteína y el desplazamiento de elementos

esenciales, pues los metales pueden romper el equilibrio oxidativo mediante la inducción de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y ascorbato peroxidasa (APX).

Se ha notificado una amplia variedad de metales que pueden ser tóxicos si son consumidos en cantidades relativamente pequeñas o por periodos de tiempo prolongados, como las sustancias químicas adicionadas a los alimentos, ya que estos pueden competir con otros metales esenciales o compiten y bloquean sitios activos en enzimas; siendo responsables de algunas enfermedades como el cáncer, mutaciones genéticas y de una serie de alteraciones en humanos y estudios con animales.

IX. CONCLUSIONES

El arsénico presentó mayor daño citotóxico que plomo, cadmio y cobalto en las células epiteliales del intestino, siendo más severo el daño en las células cuando estas se encuentran fuera del tejido.

El cadmio y cobalto, requieren de concentraciones más elevadas que las utilizadas para arsénico y plomo para causar efecto tóxico en células epiteliales de intestino delgado.

De acuerdo a las dos técnicas utilizadas, frotis y células libres, para medir el daño citotóxico, fue más notable la toxicidad inducida por los metales estudiados en el estudio de células libres.

El daño citotóxico presentado por cada metal, fue dependiente de la concentración de cada metal estudiado.

X. PERSPECTIVAS

- ✚ Es necesario realizar estudios con otros tipos de células normales y cancerosas, para observar el efecto citotóxico causado por As, Cd, Co y As y otros compuestos derivados
- ✚ Se plantea realizar el estudio con otros metales pesados y observar el daño que podrían causar en diversas células.
- ✚ Es esencial llevar a cabo otro tipo de estudios para evaluar efectos tales como; carcinogénicos, mutagénicos, sobre la reproducción y desarrollo.
- ✚ Es necesario realizar estudios In vivo por diversas vías de administración con los metales anteriormente probados y otros, para observar cualquier reacción que pudiesen ocurrir en cualquier parte u órgano de los animales.

XI. REFERENCIAS

- ✓ Achanzar WE, Diwan BA, Liu J, Quader ST, Webber J, Waalkes MP. *Cadmium-induced malignant transformation of human prostate epithelial cells*. *Cancer Res*. 61:455-458, 2001.
- ✓ Acharya U.R., S. Acharya and m. Mishra. *Lead Acetate Induced Cytotoxicity in Male Germinal Cells of Swiss Mice*, *Industrial Health*, 41:291-294, 2003.
- ✓ Adalis D., Gardner, D. E., Miller, F. J., and Coffin, D. L., *Toxic effects of cadmium on ciliary activity using a tracheal ring model system*. *Environ. Health Res*. 13:111-120, 1977.
- ✓ Adair B. M., Hudgens, E. E. and Schmitt, M. T., *Environmental Res.*, 101 (2): 213-204, 2006.
- ✓ Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Toxicological Profile for Cadmium*. US Department of Human and Health Services, 1999.
- ✓ Ahsan H., Chen, Y. and Parvez, F., *Am. J. Epidemiol*. 163 (12): 1138-1148, 2006.
- ✓ Alexandersson R., *Arch. Environmental Health*, 43:299-303, 1988.
- ✓ Allen Matthew J., Ben J. Myer, Peter J. Millet, Neil Rushton. *The effects of particulate cobalt, chromium and cobalt-chromium alloy on human osteoblast-like cells in vitro*. *J Bone Joint Surg*, 79-B: 475-82, 1997.
- ✓ Applegate L. A, Luscher P., Tyrrell R. M. *Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells*. *Cancer Res* 51:974-978, 1991.

- ✓ Aposhian H. Vasken and Mary M. Aposhian. *Arsenic Toxicology*. Department of Molecular and Cellular Biology, the University of Arizona, Life Sciences South, April 19, 2005.
- ✓ Apostoli P., Bartoli, D., Alessio, L., *Occupational Environmental Medical*. 56: 825-853, 1999.
- ✓ ATSDR. *Toxicological Profile for Arsenic TP-92/09*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Center for Disease Control, Atlanta, GA, 1993.
- ✓ ATSDR. *Toxicological Profile for Arsenic. Draft for public comment*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA. 29-182, 2005. Aydin, H. H., Celik, H. A., Deveci, R., *Biology Trace Elements*. 95: 139-153, 2003.
- ✓ Bagchi D., Joshi, S. S., Bagchi, M., J., *Biochemistry Molecular Toxicology*. 14:33-41, 2000.
- ✓ Baird C., *Environmental Chemistry*. 2nd Ed. W.H. Freeman y Company, 1999.
- ✓ Baker S. Herrchen M, Hund-Rinke K, Klein W, Kördel W. Peijnenburg W., Barry P.S.I., *Brit. J. Industrial Medical*. 32: 119-139, 1975.
- ✓ Bastian Susanne, Wibke Busch, Dana Kühnel, Armin Springer, Tobias Meißner, Roland Holke, Stefan Scholz, Maria Iwe, Wolfgang Pompe, Michael Gelinsky, Annegret Potthoff, Volkmar Richter, Chrysanthy Ikonomidou, and Kristin Schirmer, *Toxicity of Tungsten Carbide and Cobalt-Doped Tungsten Carbide Nanoparticles in Mammalian Cells in Vitro*, Environmental Health Perspectives, 117(4), April 2009.
- ✓ Bencko V., *Environmental Health Perspect*. 19:179-182, 1977.
- ✓ Bencko V., in *Advances in Modern Environmental Toxicology, Genotoxic and Carcinogenic Metals: Environmental and Occupational*

- Occurrence AND Exposure*, Fishbein, L., Furst, A., and Mehlman, M. A., Eds., Princeton Scientific, Princeton, NJ, 9, 1, 1987.
- ✓ Berg J., *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, 19: 405-421, 1990.
 - ✓ Bleecker M. L., Lindgren, K. N., and Ford, D. P., *Neurology*, 48: 639-645, 1997.
 - ✓ Boudene C.I., *Bull. Academy Natural Medical*, 166:327, 1982.
 - ✓ Braman R. S., and Foreback, C. C., *Science*. 182:1247-1249, 1973.
 - ✓ Brooks W. E., *Geological Survey minerals yearbook*. USGS, 24-25, 2005.
 - ✓ Brown R. S., Hingerty, B. E., Dewan, J. C., and Klug, A., *Nature*, 303: 543-546, 1983.
 - ✓ Buchet J. P. and Lauwerys, R., *Arch. Toxicology.*, 57: 125-129, 1985.
 - ✓ Bucher J. R., Elwell, M. R., Thompson, M. B., *Fundam. Appl. Toxicol.*, 15:357-372, 1990.
 - ✓ Buchko G. W., Hess N. J., and Kennedy M. A., *Carcinogenesis*. 21: 1051-1057, 2000.
 - ✓ Budavari S., O'Neil, M. J., Smith, A., y col., *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. 13: 440-462, 2001.
 - ✓ Calderon R. L., Hudgens, E., Le, C. X., *Environmental Health Perspective*. 107, 663-667, 1999.
 - ✓ Camarasa G. J. M., *Acta Derm. Venereal*. 47:287-292, 1967.
 - ✓ Campbell D., Gonzalez, M., and Sullivan J. B., in *Hazardous Material Toxicology*, Sullivan, J. B., and Kruger, G. R., Eds., Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 814-823, 1992.
 - ✓ Carapella S. C., *Kirk-Othmer Eyclopedia of Chemical Technology*. (J. I. Kroschwitz, and M. Howe-Grant, Eds.). New York. 3: 624-633, 1992.
 - ✓ Carlberger G., *Acta Radiol.Suppl*. 205:1-126, 1961.

- ✓ Caussy D., Case studies of the impact of understanding bioavailability: arsenic. *Ecotoxicol Environ*, 56: 164-173, 2003.
- ✓ Challenger F., *Adv. Enzymol.*, 12:429-491, 1951.
- ✓ Chamberlain A. C., *Scientific Biology*. 224:149-182, 1985.
- ✓ Chang W. C., Chen, S. H., Wu, H. L., *Toxicology*. 69 (1): 101-110, 1991.

- ✓ Charbonneau S. M., Spencer, K., Bryce, F., *Bull Environmental Contamination Toxicology*. 20: 470-477, 1978.
- ✓ Chen C. J., Chen, C. W., Wu, M. M. and Kuo, T. L., *Br. J. Cancer*, 66: 888-892, 1992.
- ✓ Chen C.J., Chiou, H. Y., Huang, W. I., *In Arsenic: Exposure and Health Effects*. (C. O, Abernathy, R. L. Calderon, and W. R. Chappell, Eds.), Chapman y Hall, London. 124-134, 1997.
- ✓ Chen Liuji, Xianqiang Yang, Hongli Jiao and Baolu Zhao. *Tea Catechins Protect Against Lead-Induced Cytotoxicity, Lipid Peroxidation, and Membrane Fluidity in HepG2 Cells*, *Toxicological Sciences* 69:149-156, 2002.
- ✓ Cherian M. G., Howell S. B., Imura N., Klaassen C. D., Koropatnick J., Lazo J. S., and Waalkes M. P. *Role of metallothionein in carcinogenesis*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 126:1-5, 1994.
- ✓ Chiou H.Y., Chiou, S. T., Hsu, Y. H., *Am. J. Epidemiology*, 153: 411-418, 1995.
- ✓ Chiou H. Y. Hsueh, Y. M., Liaw K. F., *Cancer Res.*, 55: 1296-1300, 2001.
- ✓ Chuang H. Y., Schwartz, J., Tsai, S. Y., *Occupational Environmental Medical*. 57:588-594, 2000.

- ✓ Claudio E.S., Godwin, H.A., and Magyar, J.S., *Progress Inorg. Chem.* 51: 1-144, 2003.
- ✓ Coates E. O., and Watson, J. H. L., *Ann. Intern. Med.*, 75:709-716, 1971.
- ✓ Cohen M. S., Arnold L.L., Eldan M., Schoen A.S., Beck B.D., *Methylated arsenicals: the implications of metabolism and carcinogenicity studies in rodents to human risk assessment.* Crit. Rev. Toxicol., 36:99-133, 2006.
- ✓ Cohen M. Samuel, Ohnishi Takamasa, Lora L. Arnold, X. Chris Le. *Arsenic-induced bladder cancer in an animal model.* Toxicology and Applied Pharmacology 222: 258-263, 2007.
- ✓ Coles B. L., *Arch. Dis. Child* 30: 121-126, 1955.
- ✓ Comar C.L., and Davis, G.K., *J. Biol. Chem.*, 170:379-389, 1947.
- ✓ Concha G. F., Vogler, G., Nermell, B., *Int. Arch. Occup. Environmtnal Health.* 71: 42-46, 1998.
- ✓ Conner E. A., Yamauchi, H., Fowler, B. A., *J. Exposure Analysis and Environmental Epidemiol.* 3, 431-440, 1993.
- ✓ Cooney R. V. Mumma, R. O., and Benson, A. A., *Proc Ntl. Acad. Sci. USA*, 75: 4262-4264, 1978.
- ✓ Crecelius E. A., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 18: 227-230, 1977.
- ✓ Cruz Vallejo, V. L. y Morales Ramírez, *Cinética de inducción de daño en el ADN por la exposición de leucocitos de ratón in vivo a MNU.* Revista electrónica salud pública y nutrición. Depto. Biol. ININ. AP18-1027 México, D.F. Consultado el día 09 de Marzo del 2008 en: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/genetica/index.html>.
- ✓ Csanaky I., Nemeit, B., and Gregus, Z., *Toxicology.* 183(1-3):77-91, 2003.

- ✓ Cui X., Kobayashi, Y., Hayakawa, T., *Toxicology Science*. 82(2), 478-487, 2004.
- ✓ Dabeka R. W., and McKenzie, A. D., *J. AOAC Int.*, 78: 897-909, 1995.
- ✓ Davison R. L., Natusch, D. F. S., Wallace, J. R., *Environmental Science Technology*. 8:1107-1113, 1974.
- ✓ De Temmerman L. and Hoenig M., *J. Atmospheric Chemical*. 49:121-135, 2004.
- ✓ Delpeux S., Szostak, K., Frackowiak, E., J. *Nanoscience Nanotechnology*, 2: 481-484, 2002.
- ✓ Domingo J. L., *Rev. Environmental Contamination Toxicology*, 108:105-132, 1989.
- ✓ Dong Z., *Environmental Health Perspective*. 100 (5): 757-759, 2002.
- ✓ Drebler, J., K. Schulz, y col., "Lethal manganese-cadmium intoxication. A case report." *Archives of Toxicology* 76: 449-451, 2002.
- ✓ Dugast P., *Contibution á l'étude de la contamination des végétaux par le plomb et cadmiun*. Thèse Doct. Ing. I.N.A., Paris Grignon, 1978.
- ✓ Dupin H., Cuq J. L., Malewiak M. I., Leynaud-Rouand C, Berthier A.M., *La alimentación humana*. Bellaterra, 1997.
- ✓ Edmonds J. S. And Francesconi, K. A., *Mar. Pollut. Bull.* 12: 92-94, 1981.
- ✓ Eguchi N., Kuroda K., Endo G., Metabolites of Arsenic Induced Tetraploids and Mitotic Arrest in Cultured Cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Springer-Verlag New York Inc., 32:141-145, 1997.
- ✓ Ehle A. L., and McKee, D. C., *Crit. Rev. Toxicology*. 20: 237-255, 1990.

- ✓ Eklund G., Linden A., Tallkvist J., Oskarsson A., Bioavailability of cadmium from in vitro digested infant food studied in Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 4168-4174, 2003.
- ✓ Elinder C. G. and Nordberg, M., in *Cadmium and Health*, Friberg, F.L. et al., CRC Press, Boca Raton, FL, 65,1985.
- ✓ Epstein E., *Land application of sewage sludge and biosolids*. Lewis Publishers. CRC Press. Boca Raton, USA. 201, 2002.
- ✓ Fauchet R, Fardel O. *Potassium antimonyl tartrate induces caspase- and reactive oxygen speciesdependent apoptosis in lymphoid tumoral cells*. *Br J Haematol*, 119: 608-615, 2002.
- ✓ Filipic M., and Hei T. K., *Mutant. Res.*, 546: 81-91, 2004.
- ✓ Filon F. L., Maina G., Adami G., y col., *International Archieve Occupational Environmental Health*. 77:85-89, 2004.
- ✓ Foo S.C., Khoo N. Y., Heng A., *Int. Arch. Occupational Environmenal Health*. 65: S83-S86, 1993.
- ✓ Fotakis George, Timbrell John A., *In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride*. Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved, 160:171-177, 2006. www.elsevier.com.
- ✓ Foulkes E. C., *Toxicology*, 69: 177-185, 1991.
- ✓ Foulkes E. C. and Bergman D., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 120: 89-95, 1993.
- ✓ Friberg L., Elinder C.-G., and Kjellstrom T., In *Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal*, 2:1-246, 1986.
- ✓ Fukumoto, K., Karai, I., and Horiguchi, S., *Effect of lead on erythrocyte membranes*. *Br. J. Ind. Med.* 40, 220-223, 1983.

- ✓ Gabridge Michael G. y Meccolit Rose Ann. *Cytotoxicity and Ciliostasis in Tracheal Explants Exposed to Cadmium Salts*. Environmental Health Perspectives, 44: 189-196, 1982.
- ✓ Garcia M, Quintero R, López-Munguia A. *Biotecnología Alimentaria*. Limusa, Mexico, 2000.
- ✓ Garcia Sanchez E., Kitab Al-Agdiya. *Tratado de los alimentos*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. I, 1992.
- ✓ Gennart J. P., Bernard A., and Lauwers R., *Int. Arch. Occupational Environmental Health*. 64: 49-57, 1992.
- ✓ Gerhardsson L., Dahlin L., Knebel. *Environmental Health Perspective*. 110: 115-117, 2002.
- ✓ Germano. *Induction of Autophagic Cell Death in Malignant Glioma Cells by Arsenic Trioxide*, American Association for Cancer Research, 63:2103-2108, May 1, 2003.
- ✓ Gideon O. Campos, C. Guillerman, L. and Salgot. M. *Wastewater treatment, renovation and reuse for agricultural irrigation in small communities*. *Agricultural Water Management*. 36:141-156, 1998.
- ✓ Gradecka D.; Palus, J.; Wasowicz W.: *Selected mechanisms of genotoxic effects of inorganic arsenic compounds*. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, 14(4):317-328, 2001.
- ✓ Graham-Evans Barbara, Paul B. Tchounwou and Hari H. P. Cohly, *Cytotoxicity and Proliferation Studies with Arsenic in Established Human Cell Lines: Keratinocytes, Melanocytes, Dendritic Cells, Dermal Fibroblasts, Microvascular Endothelial Cells, Monocytes and T-Cells*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 4:13-21, 2003.
- ✓ Greger J. L., *Aluminum content of the American diet*. *Food Technol.*, 39(5):73, 1985.

- ✓ Groten J.P, Van Bladeren P.J., *Cadmium bioavailability and health risk in food*. Trends Food Science Technology, 5, 50-55, 1994.
- ✓ Gulson B.L., Mizon K.J., Korsch M.J. y Howarth D., *The science of the total environment*. 181: 223-230, 1996.
- ✓ Gurer H., Ozgunes H., Neal R., Spitz D. R., and Ercal N., *Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead-exposed rats*. Toxicology 128, 181-189, 1998.
- ✓ Hamilton E. I., *Science Total Environment*, 150: 7-39, 1994.
- ✓ Hanck D. A. and Sheets, M. F., *J. Physiol.*, 454: 267-298, 1992.
- ✓ Harding H. E., *Br. J. Ind. Med.*, 7: 76-78, 1950.
- ✓ Harlan W. R., Landis J. R., Schmutz R. L., Goldstein L. G., *J. A. M. A.*, 253, 530, 1985.
- ✓ Hartwig A., Asmuss M., Blessing H., *Food Chemistry Toxicology*. 40: 1179-1184, 2002.
- ✓ Hayes J. A., Snider G. L., and Palmer K. C. *The evolution of biochemical damage in the rat lung after acute cadmium exposure*. Am. Rev. Resp. Dis. 113: 121-130, 1976.
- ✓ Hengstler J. G., Bolm-Audorff U., Faldum A., *Carcinogenesis*. 24, 63, 73, 2003.
- ✓ Hoet Peter M. H., Goedele Roesems, Maurits G. Demedts y Benoit Nemery. *Activation of the hexose monophosphate shunt in rat type II pneumocytes as an early marker of oxidative stress caused by cobalt particles*, Arch. Toxicol. 76:1-7, 2002.
- ✓ Hu XM, Hirano T, Oka K. *Arsenic trioxide induces apoptosis in cells of MOLT-4 and its daunorubicin-resistant cell line via depletion of intracellular glutathione, disruption of mitochondrial membrane potential and activation of caspase-3*. Cancer Chemother Pharmacol, 52: 47-58, 2003.

- ✓ Hursh J. B., and Suomela J., *Acta Radiologica*. 7: 108-120, 1968.
- ✓ IARC: *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. Supplement F. Overall Evaluation of Carcinogenicity*. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization, 29-57, 1987.
- ✓ IARC. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing Industry*, Lyon, France, 58:119-237, 1993.
- ✓ IARC. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* No.83, 2003.
- ✓ Ishihara N., Koizumi, and Yoshida, A., *Arch. Environmental Health*. 42: 356-360, 1987.
- ✓ Ito Y., Niiya Y., Kurita H., Shima S., and Sarai S., *Serum lipid peroxide level and blood superoxide dismutase activity in workers with occupational exposure to lead*. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 56: 119-127, 1985.
- ✓ Jacobson K. B., and Turner J. E., *The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids*. *Toxicology*, 16:1-37, 1980.
- ✓ Jarup L., L. Hellstrom y col., "Low level exposure to cadmium and early kidney damage: the OSCAR study." *Occupational and Environmental Medicine* 57: 668-672, 2000.
- ✓ Jensen A. A., and Tüchsen F., *Crit. Rev. Toxicology*, 20:427-437, 1990.
- ✓ Jimi S., Uchiyama, Takaki A., *Ann. N. Y. Academy Science*. 1011: 325-331, 2004.
- ✓ John M. K., Van Laerhoven C. J., Chuah H. M., *Environmental Science Technology*, 5, 1006, 1972.

- ✓ Jourdheuil D., Vaamanen P., and Meddings J. B., *Am. J. Physiol.*, 264: G1009-G1015, 1993.
- ✓ Jun Araya, Muneharu Maruyama, Akira Inoue, Tadashi Fujita, Junko Kawahara, Kazuhiko Sassa, Ryuji Hayashi, Yukio Kawagishi, Naohiro Yamashita, Eiji Sugiyama, and Masashi Kobayashi. *Inhibition of proteasome activity is involved in cobalt-induced apoptosis of human alveolar macrophages*, AJP-Lung Articles in Press, Published on June 5, 2002.
- ✓ Kabata-Pendias A. y Pendias H., *Trace elements in soils and plants* CRC., Florida, 2001.
- ✓ Kadiiska M. B., Maples K. R., and Mason R. P., *Arch. Biochem. Biophys.* 15: 98-111, 1989.
- ✓ Kanzawa Takao, Yasuko Kondo, Hideaki Ito, Seiji Kondo and Isabelle Lecureur V, Le Thiec A, Le Meur A, Amiot L, Drenou B, Bernard M, Lamy T, Lee Te-Chang and Ho I-Ching. *Differential Cytotoxic Effects of Arsenic on Human and Animal Cells*. *Molecular Mechanisms of Metal Toxicity and Carcinogenicity Environmental Health Perspectives* 102(3):10-17, September 1994.
- ✓ Keane M. J., Hornsby-Myers, J. L., Stephens, J. W., *Chem. Res. in Toxicology*, 15: 1010-1016, 2002.
- ✓ Kehoe R. A., *Food Chemical Toxicology*. 25: 425-493, 1987.
- ✓ Kent N. L., and McCance R. A., *Biochemistry J.*, 35:877-883, 1941.
- ✓ Koh D., Ng V., Chua L. H., *Occupational Environmental Medical*. 60: 696-698, 2003.
- ✓ Koizumi, T., H. Shirakura, H. Kumagai, H. Tatsumoto y T. Suzuki. *Mechanism of cadmium induces cytotoxicity in rat hepatocytes: cadmium induce active oxygen - related permeability changes of the plasma membrane*. *Toxicology* 114: 125-134, 1996.

- ✓ Korotkov S., I. Skuiskii y V. Giazunov. *Cd²⁺ effects on respiration and swelling of rat liver mitochondria were modified by monovalent cations*. J. Inorg. Biochem. 70: 17-23, 1998.
- ✓ Kovala T., Matiainen E., Mannelin T., *Occupational Environmental Medical*. 54: 487-493, 1997.
- ✓ Léonard A., and Lauwerys R. *Mutat Res.*, 239:17-27, 1990.
- ✓ Lewis R., Occupational Exposures. In *Occupational and Environmental Medicine*, LaDou, J, editor. Stamford, Connecticut: Appleton y Lange, 1997.
- ✓ Li W., Chou I. N. *Effects of sodium arsenite on the cytoskeleton and cellular glutathione levels in cultured cells*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 114: 132-139, 1992.
- ✓ Li Yong Ming and John D. Broome. *Arsenic Targets Tubulins to Induce Apoptosis in Myeloid Leukemia Cells*. Department of Laboratories, North Shore University Hospital, Manhasset, New York 11030 and Department of Pathology, New York University School of Medicine. *Cancer Research* 59: 776-780, February 1, 1999.
- ✓ Lindgren K. ., Masten V. L., Ford D. P., *Occupational Environmental Medical*. 53: 472-477, 1996.
- ✓ Lindner L., *Toxicología de alimentos*. Editorial. Arribia. Zaragoza, España. 2: 163-166, 1995.
- ✓ Linnainmaa M., and Kiilunen, M., *International Archieve Occupational Environmental Health*. 69:193-200, 1997.
- ✓ Lison D., Carbonnelle, P., Mollo, L., *Chem. Res. Toxicol.*, 8:600-606, 1995.
- ✓ Lison D., De Boeck, M., Verougstraete, V., et al., *Occup. Env. Med.* 26: 619-625, 2001.

- ✓ Lloyd M. D., Pederick, R. L., Natesh, R., *Biochemistry J.*, 385: 715-720 Part 3, 2005.
- ✓ Louis W. Chang, *Toxicology of metals*. Lewis Publishers, New York. 1993.
- ✓ Mahmoodabady Ali Beman Zaree, Ph.D., Mehdi Saberi, Ph.D., Hossein Eimani, Ph.D. Jila Pyrzad, M.Sc., Reza Rezaee Sharifabady, M.Sc., *Cytotoxic and Oxidative Stress Caused by Cadmium and Lead on Human Skin Fibroblast Cells*. *Yakhteh Medical Journal*, 8(3):12-111, Autumn 2006.
- ✓ Maizlish N. A., Parra, G., and Feo, O., *Occup. Environmental Med.*, 52: 408-414, 1995.
- ✓ Marcano Letty, Faria, Clarisa de R, Carruyo, Ingrid, Montil Xiomara , *Cadmium citotoxicity in mice hepatocytes and implicatios on tropical environments*. *Revista de biología tropical*. 54(2): 257-263, 1996.
- ✓ Marcano Letty, Faría Clarisa de R., Carruyo Ingrid y Montiel Xiomara. *Citotoxicidad del cadmio en hepatocitos de ratón albino y sus posibles implicaciones en ambientes tropicales*. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744)*, 54(2): 257-263, June 2006.
- ✓ Marcussen P. V., *Acta Derm. Venereol.*, 43:231-234, 1963.
- ✓ Mariné A. F. y M. C. Vidal. *Influencia del medio ambiente en las relaciones entre la alimentación y salud*. Departamento de Nutrición y Bromatología. Universidad de Barcelona, 2000.
- ✓ Martínez-Beltrán. *Irrigation with saline water: benefits and environmental impact*. *Agricultural Water Management*. 38:223-234, 1999.
- ✓ Mataix J., *Nutrición y Alimentación Humana*. Ed. Ergon, 2, 2002.
- ✓ McCafferty-Grad J, Bahlis N. J, Krett N, Aguilar T. M, Reis I, Lee K. P, Boise L. H. *Arsenic trioxide uses caspase-dependent and caspase-*

- independent death pathways in myeloma cells. Mol Cancer Ther, 2: 1155-1164, 2003.*
- ✓ McLaughlin M. J, Parker D. R, Clarke J. M., *Metals and micronutrients-food safety issues. Field Crops Res., 60: 143-163, 1999.*
 - ✓ Moore M. R., Meredith, P. A., Watson, W. S., *Food Cosmetics Toxicology. 18: 399-405, 1980.*
 - ✓ Misra R.R., Hochadel J.F., Smith G.T., Cook J.C., Waalkes M.P. and Wink D.A. *Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by release of the metal from metallothionein. Chem. Res. Toxicol., 9:326-332, 1996.*
 - ✓ Misra R. Rita, John E. Page, George T. Smith, Michael P. Waalkes, and Anthony Dipple. *Effect of Cadmium Exposure on Background and anti-5-Methylchrysene-1, 2-dihydrodiol 3, 4-Epoxy-Induced Mutagenesis in the supF Gene of pS189 in Human Ad293 Cells, Chem. Res. Toxicol., 11(3):211-216, 1998.*
 - ✓ Monteiro H. P., Abdalla D. S., Augusto O., and Bechara E. J., *Free radical generation during delta-aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies. Arch. Biochem. Biophys. 271: 206-216, 1989.*
 - ✓ Morlon H., C. Fortin, C. Adam, and J. Garnier-Laplace. *Cellular quotas and induced toxicity of selenite in the unicellular green alga Chlamydomonas reinhardtii. Radioprotection, 40: 101-106, 2005.*
 - ✓ Nagababu P., Naveena lavanya latha J., M. Rajesh and S. Satyanarayana. *DNA-Binding and Cytotoxicity of the Cobalt (III) Ethylenediamine Pyrazole Complex [Co (en) ₂(pyz) ₂]³⁺, J. Iran. Chem. Soc., 6(1):145-152, March 2009.*
 - ✓ NAS. Arsenic. National Academy of Science. Washington D.C., 1977.

- ✓ Newman-Taylor, A., Cadmium. *Environmental and Occupational Medicine*. W. N. Rom. Philadelphia, Lippincott-Raven: 1005-1010, 1998.
- ✓ Novikova E.P. *Fed. Proc. Transl. Suppl.*, 23:459-460, 1964.
- ✓ Nriagu J. O., *Science*. 281: 1622-1623, 1998.
- ✓ Omokhodion F. O., and Crockford G. W., *Science Total Environmental*. 103: 113-122, 1991.
- ✓ Patlolla A. K., *Differential Cytotoxicity and Gene Expression in Human Liver Carcinoma (HepG2) Cells Exposed to Arsenic Trioxide, and Monosodium Acid Methanearsonate (MSMA)*, *International Journal of Molecular Sciences*, 3:1117-1132, 2002.
- ✓ Patterson C., Ericson J., Manea-Krichten M., *Science Total Environment*. 107: 205-236, 1991.
- ✓ Pereira Figueiredo Maria E., Li Zongmin, Jansen Marlon, and Rockwell Patricia. *N-Acetylcysteine and Celecoxib Lessen Cadmium Cytotoxicity Which Is Associated with Cyclooxygenase-2 Up-regulation in Mouse Neuronal Cells*, *J. Biol. Chem.*, 277(28):25283-25289, July 12, 2002.
- ✓ Punsar S., Erämetsä O., Karvonen M. J., *J. Chronic Dis.*, 28: 259-287, 1975.
- ✓ QU Feng-lian , LI Yan-fen , WAN Yun-xia , MA Jian-hui, SHI Wei, CHU Da-tong and SUN Yan. *Effects of Arsenic Trioxide on Human Renal CellCarcinoma Lines in Vitro*. *Cancer Hospital,Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, CJIM*, 10(1):48–51, 2004.
- ✓ Qu Wei, Bhalchandra A. Diwan, Jie Liu, Robert A. Goyer, Tammy Dawson, John L. Horton, M. George Cherian, and Michael P. Waalkes. *The Metallothionein-Null Phenotype Is Associated with Heightened Sensitivity to Lead Toxicity and an Inability to Form Inclusion Bodies*, *American Journal of Pathology*, 160(3), March 2002.

- ✓ Quintanilla-Vega B., Smith D. R., Kahng M. W., *Chemico-Biological Interactions*, 98: 193-209, 1995.
- ✓ Raben A. S., Rogailin V. I., Alemina A. N., *In Information the 2nd Conference of Dermatologists and Venereologists of the Kuznets Basin*. 130-134, 1966.
- ✓ Rabinowitz M. B., Kopple J. D., and Wetherill G. D., *Am. J. Clinical Nutritional*. 33: 1784-1788, 1980.
- ✓ Reilly C., *Metal contamination of food*. Applied Science Publisher Ltd. London, 1980.
- ✓ Rensing C., Underlying issues including approaches and information needs in risk assessment. *Ecotoxicol Environ*, 56: 6-19, 2003.
- ✓ Rhoads K., and Sanders C. L., *Environmental Res.*, 36:359-378, 1985.
- ✓ Roesems G., Hoet P. H. M., Dinsdale D., Demedts M. and Nemery B., *In Vitro Cytotoxicity of Various Forms of Cobalt for Rat Alveolar Macrophages and Type II Pneumocytes*, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 162(1);2-9, 1 January 2000.
- ✓ Rossman T. G., Roy N. K., and Lin W., *In Cadmium in the Human Environment: Toxicity and Carcinogenicity* (Nordberg G. F., Herber R. F. M., and Alessio L., Eds.), 367-375, 1992.
- ✓ Rousselot P.; Laboume S.; Marolleau J. P.; Larghero T.; Noguera M. L.; Brouet J. C.; Fermand J. P. Arsenic trioxide and melarsoprol induce apoptosis in plasma cell lines and in plasma cells from myeloma patients. *Cancer Res.*, 59:1041-1048, 1999.
- ✓ Ruchan Uslu, Ulus Ali Sanli, Canfeza Sezgin, Bulent Karabulut, Ender Terzioglu, Serdar Bedii Omay and Erdem Goker. *Arsenic Trioxide-mediated Cytotoxicity and Apoptosis in Prostate and Ovarian Carcinoma Cell Lines*. Departments of Medical Oncology and Hematology [R. U., U. A. S., C. S., B. K., S. B. O., E. G.], and Department of Immunology [E.

- T.], Ege University School of Medicine, 35100, Izmir, Turkey. *Clinical Cancer Research* Vol. 6, 4957-4964, December 2000.
- ✓ Sanders C. L., Hadley J. G., Conklin A. W., and Adee R., *Antagonism of cadmium-induced pulmonary toxicity by WR2721*. *Toxicol.* 2:323-328, 1978.
 - ✓ Schade S. R., *Lab. Clin. Med.*, 75:435-442, 1970.
 - ✓ Schinitman N. I. *Alimentos: Prevención de su contaminación*.31:03-05, 2005.
 - ✓ Schirmacher U. O. E., *Br. Med. J.*, 1: 544-545, 1967.
 - ✓ Schroeder H. A., Nason A. P., and Tipton I. H., *J. Chronic Dis.*, 20: 869-890, 1967.
 - ✓ Schwartz B. S., Lee B. K., Lee G. S., *Amb. J. Epidemiology*. 153: 453-464, 2001.
 - ✓ Serpil Unyayar, Ayla Celik, F. Ozlem Cekic, Aysin Gozel. *Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in Allium sativum and Vicia faba*. Published by Oxford University Press on behalf of the UK Environmental Mutagen Society, pages 1-5, January 24, 2006.
 - ✓ Sezgin Canfeza, Sanli Ulus Ali, Uslu Ruchan, Erdem Göker. *Arsenic Trioxide Has Additive Cytotoxic Effects on MCF-7 Breast Cancer Cell Line With Taxanes*, *Turk J Med Sci.*, 32:439-444, 2002.
 - ✓ Shao Qin-Shu, Ye Zai-Yuan, Ling Zhi-Qiang, Ke Jin-Jing. *Cell cycle arrest and apoptotic cell death in cultured human gastric carcinoma cells mediated by arsenic trioxide*. The WJG Press and Elsevier Inc., *World J Gastroenterol*, 11(22):3451-3456, 2005.
 - ✓ Shimizu,M., Hochadel,J.F., Abshire,M.K. and Waalkes,M.P. *Effects of glutathione depletion on cadmium-induced cytotoxicity and proto-oncogene activation in cultured rat myoblasts*. *J. Toxicol. Environ. Health*, 51:609-621, 1997.

- ✓ Shin Jung-Hun, Lim Kyung-Min, Noh Ji-Yoon, Ok-Nam Bae, Seung-Min Chung, Moo-Yeol Lee, and Jin-Ho Chung. *Lead-Induced Procoagulant Activation of Erythrocytes through Phosphatidylserine Exposure May Lead To Thrombotic Diseases*, *Chem. Res. Toxicol.*, 20 (1):38-43, 2007.
- ✓ Shuttleworth V. S., Cameron, R. S., Alderman, G., *Practitioner*, 186: 760-764, 1961.
- ✓ Silbergeld E. K., Waalkes, M., and Rice, J. R., *Am. J. Ind. Medical*. 38: 316-323, 2000.
- ✓ Skerfving S., “*Criteria Document for Swedish Occupational Standards. Inorganic Lead-An Update 1991-2004*”. *National Institute of Working Life, Stockholm, Arbete och Hälsa* 3: 1-119, 1995.
- ✓ Smith T., Edmonds, C. J., and Barnaby, C. F., *Health Phys.*, 22:359-367, 1972.
- ✓ Solliway B. M., Schaffer, A., Pratt, H., *Pharmacology Toxicology*. 78: 18-22, 1996.
- ✓ Sorahan T. and N. Esmen. “*Lung cancer mortality in UK nickel-cadmium battery workers, 1947-2000.*” *Occupational Environmental Medicine* 61: 108-116, 2004.
- ✓ Stacey, N. H., Cantilena, L. R., Jr., and Klassen, C. D., *Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 53:470-480, 1980.
- ✓ Tam GKH, Charbonneau SM, Bryce F, Pomroy C, Sandi E. *Metabolism of inorganic arsenic in humans following oral ingestion*. *Toxicol Appl Pharmacol* 50:319-322, 1979.
- ✓ Tassler P. L., Schwartz, B. S., Coresh, J., *Am J. Ind. Medical*. 39: 254-261, 2001.
- ✓ Taylor D.M., *Phys. Med. Biol.*, 6:445-451, 1962.

- ✓ Tchounwou P. B., Wilson B. A., Abdelghani A. A., Ishaque A. B., and Wang Shao-Shan, Ti Zhang, Xi-Lu Wang, Li Hong, Qing-Hui Qi. *Effect of arsenic trioxide on rat hepatocarcinoma and its renal cytotoxicity.* World J Gastroenterology, 9(5):930-935, 2003.
- ✓ Tchounwou P. B.; Wilson, B.; Ishaque, A. Important considerations in the development of public health advisories for arsenic and arsenic-containing compounds in drinking water. Rev. Environ. Health, 14: 1-19, 1999.
- ✓ Tchounwou Paul B., Clement G. Yedjou, Dominique N. Foxx, Ali B. Ishaque and Elaine Shen. *Lead-induced cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma (HepG2) cells,* Molecular and Cellular Biochemistry, 255: 161-170, 2004.
- ✓ Tsuzuki Katsuyuki, Sugiyama Masayasu, and Haramaki Nobuya. DNA Single-strand Breaks and Cytotoxicity Induced by Chromate (VI), Cadmium (II), and Mercury (II) in Hydrogen Peroxide-resistant Cell Lines. Environ Health Perspective, 10(3):341-342, 1994.
- ✓ Vaglio, A. y C. Lansdriscina. *Changes in liver enzyme activity in the Teleost Sparus aurata in response to cadmium intoxication.* Ecotox. Environ. Safe. 43: 111-116, 1999.
- ✓ Valle P., *Toxicología de los alimentos. Documento de industrias agrícolas.* Universidad Autónoma de Chapingo, México, D.F. 4: 143-157, 1980.
- ✓ Verougstraete V. and D. Lison. "*Cadmium, lung, and prostate cancer: a systematic review of recent epidemiological data.*" Journal of Toxicology and Environmental Health 6(Part B): 227-255, 2003.
- ✓ Waalkes Michael P. and Diwan Bhalchandra A., *Cadmium-induced inhibition of the growth and metastasis of human lung carcinoma*

- xenografts: role of apoptosis*, Oxford Journals Life Sciences y Medicine Carcinogenesis, 20(1):65-70, 1999.
- ✓ Waalkes M. P, Rehm S, Cherian M. G. *Repeated cadmium exposures enhance the malignant progression of ensuing tumors in rats*, Toxicology Science, 54:104-109, 2000.
 - ✓ Waldron H. A. *The anaemia of lead poisoning: a review*. Br. J. Ind. Med. 23, 83-100, 1966.
 - ✓ Wildman R., Medeiros D. M., *Advanced Human Nutrition*. , Ed. CDC Pres., 2000.
 - ✓ Yanagiya Takahiro, Nobumasa Imura, Shuichi Enomoto, Yukihiro Kondo, and Seiichiro Himeno. *Reduction of cadmium cytotoxicity by manganese*, RIKEN Review 35:71-72, May 2001.
 - ✓ Yeh J. H., Chang, Y. C., and Wang, J. D., *Occupational Environmental Medical*. 52: 415-419, 1995.
 - ✓ Yokoyama K., Araki, S., Sato, H., *Ind. Health*. 38: 205-212, 2000.

XII. ANEXOS

Material de laboratorio

- Cajas petri desechables (Nunc)
- Estuche de material para disección de acero inoxidable
- Tubo cónico estéril (nunc)
- Tubos Eppendorf 1.5 ml
- Portaobjetos (Corning)
- Cubreobjetos (Corning)
- Aplicadores de madera estériles

* Todo el material utilizado para cultivo celular fue desechable

Equipos

- Cámara de Neuvauer (Marienfeld)
- Autoclave (Tuttnauer brinkmann)
- Balanza analítica (Fisher Scientific)
- Cámara de bioseguridad (Norma Scientific)
- Centrifuga digital (Eppendorf)
- Estufa de secado(Scorpion Scientific)
- Incubadora de CO₂ (Incu safe)
- Microscopio (Zeiss)

TABLAS DE CONCENTRACIÓN Y PORCENTAJE DE VIABILIDAD

Arsénico

Frotis

Concentración $\mu\text{g/ml}$ As	% Viabilidad
0	100
1	72.37
5	59.02
10	51.29
25	43.68
50	34.43
100	25.64
200	18.27

Células libres

Concentración As $\mu\text{g/ml}$	% Viabilidad
0	100
1	82.57
2.5	71.09
5	58.06
7.5	53.20
10	44.23
25	34.34
50	28.23

Cadmio

Frotis

Concentración $\mu\text{g/ml}$ Cd	% Viabilidad
0	100
250	75.35
500	69.68
750	61.57
1000	53.59
1250	42.36
1500	37.73
2000	25

Células libres

Concentración $\mu\text{g/ml}$ Cd	% Viabilidad
0	100
1	79.82
5	76.53
10	63.74
25	59.92
50	58.59
100	52.62
250	47.09
500	42.84

Cobalto

Frotis

Concentración $\mu\text{g/ml}$ Co	% Viabilidad
0	100
50	80.97
100	76.93
150	71.63
200	68.51
250	67.82
300	59.05
350	55.25
400	44.75
450	42.68

Células libres

Concentración $\mu\text{g/ml}$ Co	% Viabilidad
0	100
10	77.88
50	50.22
75	46.88
100	42.83
200	35.87
300	32.20
400	26.45
450	22.02

Plomo

Frotis

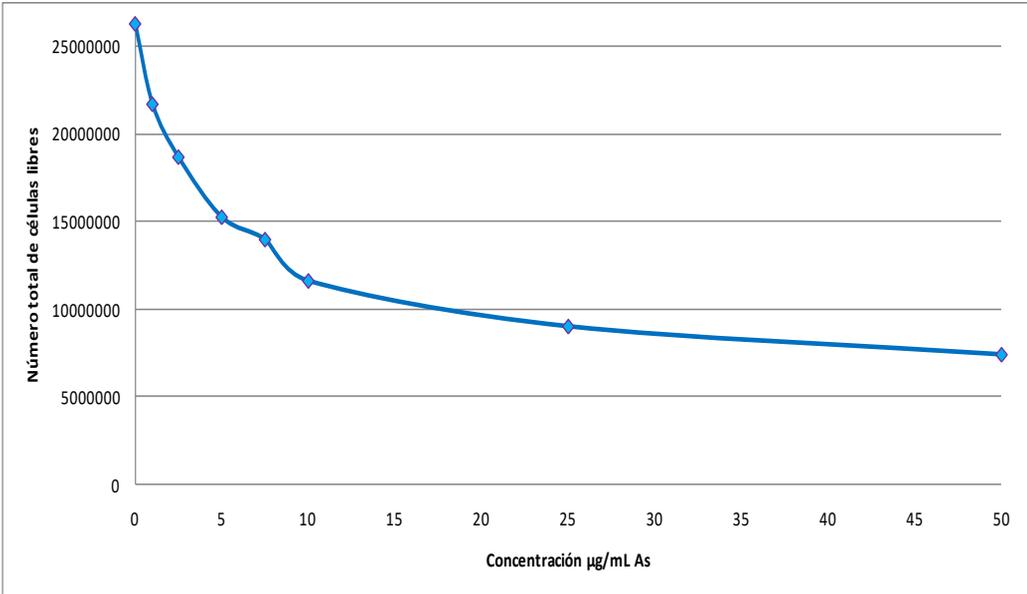
Concentración $\mu\text{g/ml}$ Pb	% Viabilidad
0	100
25	71.35
50	61.64
75	53.88
100	47.83
25	46.8
150	44.86
175	43.04
200	40.75
225	38.47
250	33.33

Células libres

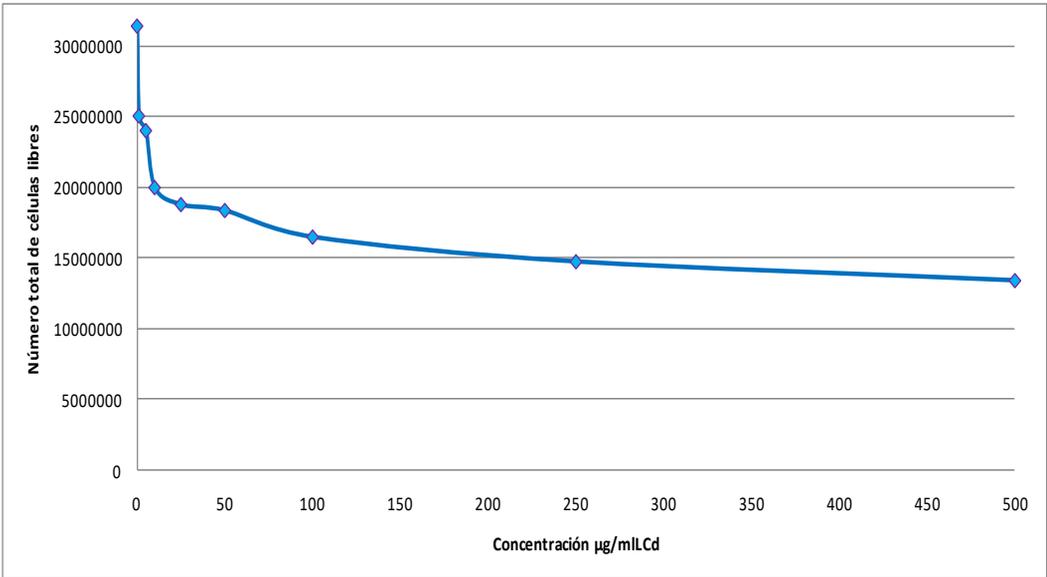
Concentración $\mu\text{g/ml}$ Pb	% Viabilidad
0	100
0.5	74.83
1	60.37
2.5	58.50
5	53.22
7.5	51.72
10	43.88
25	41.95
50	34.75
100	29.52

CURVAS DE CONCENTRACIONES CONTRA NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS LIBRES

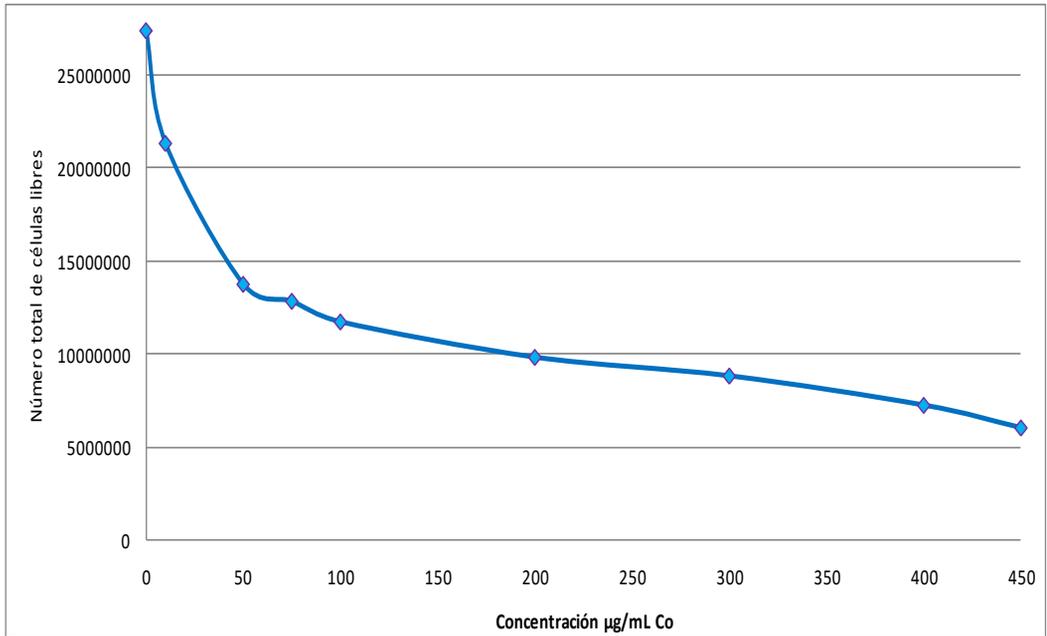
Arsénico



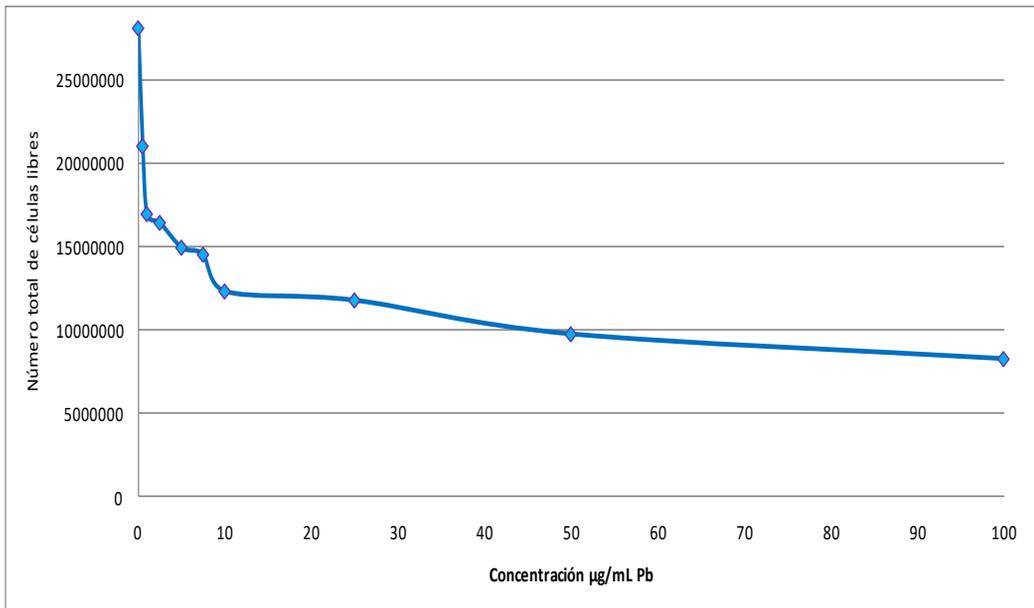
Cadmio



Cobalto



Plomo



XIII. GLOSARIO

- **Apoptosis:** Forma de muerte celular, que está regulada genéticamente.
- **Ataxia:** Trastorno caracterizado por la disminución de la capacidad de coordinar los movimientos.
- **Caspasa:** Grupo de proteínas perteneciente al grupo de las cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas.
- **Corrin (anillo):** Se forma a partir de la unión del cobalto con cuatro átomos de nitrógeno.
- **Dosis inhibitoria media (D150):** Dosis absorbida de una sustancia que causa una inhibición del 50 % a en un sistema de ensayo.
- **Eritropoyetina:** Hormona glicoproteica que estimula la formación de eritrocitos. En los seres humanos, es producida principalmente por el riñón (90%), el resto en el hígado.
- **Filariasis:** Grupo de enfermedades parasitarias en el humano y otros animales, transmitida por larvas generalmente mosquitos y moscas.
- **Glomérulo renal:** Unidad anatómica funcional del riñón donde radica la función de aclaramiento o filtración del plasma sanguíneo.
- **Hematopoyético (sistema):** Es el sistema encargado de la formación de la sangre.
- **Hemolisis:** Fenómeno de la desintegración de los eritrocitos.
- **Hiperplasia:** Aumento de tamaño de un órgano o de un tejido, debido a que sus células han aumentado en número. Puede producirse en los tejidos cuyas células se pueden multiplicar.
- **Lixiviación:** Proceso de lavado del suelo por la filtración del agua.
- **Melanosis:** Coloración negruzca de tejidos normales o patológicos debida a una infiltración anormal de melanina o de otros pigmentos.
- **Metaplasia:** Cambio de un epitelio maduro por otro maduro que puede tener un parentesco próximo o remoto. Los fenómenos de metaplasia son completamente normales en los tejidos embrionarios que tienden naturalmente a diversificar, madurar y especializar sus células.
- **T (células):** Responsables de coordinar la respuesta inmune celular constituyendo el 70% del total de los linfocitos segregando proteínas o citoquinas.
- **Tenia:** Género de platelmintos parásitos, que causan enfermedades parasitarias y se alojan en el intestino.
- **Túbulo proximal:** Parte de la nefrona, sistema que filtra la sangre que pasa a través de los riñones.
- **Wilson (enfermedad):** Trastorno hereditario en el cual hay demasiado cobre en los tejidos corporales. El exceso de cobre causa daño al hígado y al sistema nervioso.